BIBLIOTHEEK
LEESMUSEUM
AMSTERDAM.
AFD. Gnk
№ 4787

THESIS. AMSTERDAM. 4787

OVER

DE BACTERIOLOGISCHE CHOLERA-DIAGNOSTIEK.

1911

P. J. J. R. T. PILON.

LEESMUSEUM AMSTERDAM

LANE
MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
SEMPER VIRENS
1885

Gift of
Mr. William Wreden

F.G.KOSTER·BOEKBINDER·
AMSTERDAM

4787

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

OVER DE BACTERIOLOGISCHE CHOLERA-DIAGNOSTIEK.

OVER DE BACTERIOLOGISCHE CHOLERA-DIAGNOSTIEK.

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM

OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS

D^R. J. TE WINKEL,

Hoogleeraar in de Faculteit der Letteren en Wijsbegeerte

IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN

op Dinsdag 4 April 1911, des namiddags ten 4 uur,

IN DE AULA DER UNIVERSITEIT

— DOOR —

PIETER JANSEN JAKOB REINDER TONKE PILON,

ARTS.

GEBOREN TE HEEMSE.

AMSTERDAM. — J. H. DE BUSSY. — 1911.

LEESMUSEUM AMSTERDAM. M

AAN MIJN VADER.

Gekomen aan het einde van mijn studie aan de Universiteit van Amsterdam zeg ik Hoogleeraren en Doctoren, wier onderwijs ik het voorrecht had te genieten, hartelijk dank.

Met het oog op de bewerking van dit proefschrift ben ik bijzonderen dank verschuldigd aan Professor Saltet, mijn hooggeachten Promotor, voor de wijze waarop Hij aan mijne wenschen is tegemoet gekomen en het spoedige verschijnen van mijn dissertatie heeft bevorderd.

Dr. Van Loghem heeft mij steeds met niet genoeg te waardeeren bereidwilligheid geholpen bij al de moeilijkheden, die de onervarene bij de bewerking van een bacteriologisch onderwerp ontmoet. Voor Zijn leiding bij mijn arbeid betuig ik Hem hier mijn oprechten dank.

Ten slotte aan allen, die op eenigerlei wijze, in en buiten het laboratorium, bij mijn werk mij behulpzaam zijn geweest een woord van dankbare erkentelijkheid.

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/overdebacteriolo0000unse

INHOUD.

Bldz.

INLEIDING 1

HOOFDSTUK I 18

Methodes van onderzoek.

HOOFDSTUK II 51

Bloed-alkali-agar-kweekgronden.

HOOFDSTUK III 85

Het El Tor-vraagstuk en de vertrouwbaarheid van de agglutinatie-proef en de proef van Pfeiffer.

LITERATUUR.

Arens, Münch. med. Wochenschr. 1893. p. 190.

Barrenscheen, Ueber die Agglutination der Choleravibrionen. Centr. f. Bact. etc. Bd. L. S. 261.

De Besche und Kon, Untersuchungen ueber die Differenzierung von Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen mittels der Komplementbindung. Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Bd. LXII. S. 161.

Bordet, Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés. Ann. de l'Inst. Past. 1895 p. 462.

Brau et Denier, Recherches sur la toxine et l'antitoxine cholériques. Ann. de l'Inst. Past. 1906. No. 12.

Bürgers, Bakteriologische Ergebnisse der Cholera-epidemie 1909 in Ost-Preuszen. Hyg. Rundschau 1910. S. 169.

Creudiropoulo et Panayotatou, Sur un nouveau milieu pour le diagnostic du choléra. Centr. f. Bakt. etc. Bd. LV. S. 248.

Deeleman, Der Einflusz der Reaction des Nährbodens auf das Bakterienwachstum. Arb. a. d. Kais. Ges. Bd. XIII. S. 374.

Deycke, Ueber einen neuen electiven Nährboden für Cholerabazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1893. S. 888.

Deycke, Die Benutzung von Alkalialbuminaten zur Herstellung von Nährböden. Centr. f. Bakt. Bd. XVII. S. 241.

Deycke, Weltere Erfahrungen ueber die Ben. v. Alk. z. Herst. v. Nährb. Deutsche med. Wochenschr. 1894. S. 528.

Deycke und Voigtländer, Studien ueber kulturelle Nährböden. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XXIX. S. 617.

Dieudonné, Blutalkaliagar, ein Elektivnährboden für Choleravibrionen. Centr. f. Bakt. etc. Bd. 50. S. 107.

Dunbar, Zur bakteriologischen Choleradiagnose. Berl. klin. Wochenschr. 1905. No. 39.

Esch, Zum bakteriologischen Choleranachweise mittels der Blutalkali-Nährböden. Deutsche med. Wochenschr. 1910. S. 559.

Fermi, Die Mineral- und organischen Säuren, die Alkali u.s.w. zur Differenzierung der Mikro-organismen. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XXXIII. S. 208.

Friedberger, Die spezifischen Serumveränderungen bei Cholerabacillenzwischenträgern. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XL. S. 405.

Friedberger und Luerssen, Zur bakteriologischen Choleradiagnose.

Friedrichs, Der Hämoglobin-Nährboden für Cholera nach Esch. Deutsche med. Wochenschr. 1911. S. 147.

Gaffky, Bericht ueber die Thätigkeit der zur Erforschung der Cholera im Jahre 1883 nach Egypten und Indien entsandten Kommission. Arb. a. d. Kais. Ges. Bd. III.

Glaser und Hachla, Ist der Dieudonnésche Nährboden nur für Choleravibrionen elektiv? Centr. f. Bakt. etc. Bd. LVII. S. 371.

Gotschlich, Ueber Cholera- und choleraähnliche Vibrionen unter den aus Mekka zurückkehrenden Pilgern. Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Bd. LIII. S. 281.

Gruber und Durham, Münch. med. Wochenschr. 1896. S. 206.

De Haan, Over sporadische cholera. Geneesk. Tijdschr. voor Ned. Indië. 1908. blz. 461.

Hachla und Holobut, Beitrag zur Frage electiver Nährböden für Choleravibrionen Centr. f. Bakt. etc. Bd. 52. S. 299.

Haendel und Woithe, Vergleichende Untersuchungen frisch isolierter Cholerastämme mit älteren Cholera und El Tor-kulturen. Arb. a. d. Kais. Ges. Bd. XXXIV. S. 17.

Heim, Zum Nachweise der Choleravibrionen. Centr. f. Bakt etc. Bd. XXX. S. 570.

Heim, Ueber Pneumoniecoccen. Deutsche med. Wochenschr. 1907. S. 1587.

Heim, Meine Anteile an der bacteriologischen Choleradiagnose. Centr. f. Bakt. etc. Bd. LIII. S. 557.

Hesse, Ueber den Einflusz der Alkaleszenz des Nährbodens auf das Wachstum der Bakteriën. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XV. S. 183.

Hetsch, Choleraverdächtige Brechdurchfall-Erkrankungen und Todesfälle im Spreewalde im Jahre 1905.

Hübener, Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen, 1910.

Huntemüller, Der Dieudonnésche Blut-Alkali-Agar Centr. f. Bakt. etc. Bd. 50, S. 107.

Hymans van den Bergh, De cholera te Rotterdam. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 11 Sept. 1909.

Jacobsen, Untersuchungen ueber die Lebensfähigkeit der Choleravibrionen im Meerwasser. Centr. f. Bakt. etc. Bd. LVI, S. 201.

Kirchner, Arbeiten ueber die Cholera des Jahres 1905. Klin. Jahrb., Bd. XVI, Heft 1.

Kitasato, Ueber das Verhalten der Typhus- und Cholerabacillen zu säure- und alkalihaltigen Nährböden. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. III, S. 404.

Koch, Ueber bakteriologische Forschung 1890.

Koch, Ueber den augenblicklichen Stand der bakteriologischen Choleradiagnose. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 1893, S. 319.

Köhlisch, Ueber die angebliche Aenderung der Agglutinabilität der Choleravibrionen durch Aufenthalt im Wasser. Centr. f. Bact. etc. Bd. LV, S. 156.

Kolle, Ueber die Dauer des Vorkommens von Choleravibrionen in den Dejecten von Cholera-reconvalescenten. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XVIII, S. 42.

Kolle und Gotschlich, Untersuchungen ueber die bakteriologische Choleradiagnostik und Specificität des Kochschen Choleravibrio. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XLIV.

Kolle und Meinicke, Untersuchungen an den in El Tor isolierten Vibrionen. Klin. Jahrb. 1906. Bd. XV, Heft 1.

Kolle und Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Bd. III, S. 1. Ergänz. Bd. II, S. 28.

Kraus, Ueber Toxine und Antitoxine des Choleravibrio. Wien. klin. Wochenschr. 1906, No. 42.

Kraus, Ueber Choleravibrionen und verwandte Vibrionen. Centr. f. Bakt. etc. Ref. Bd. XXXVIII, Beiheft S. 84.

Kraus und Müller, Zur Frage der Blutplattenmethode, Agglutinabilität und Giftbildung frischer Choleravibrionen. Wien. klin. Wochenschr. 3 Nov. 1910.

Kraus und Prantschoff, Ueber Choleravibrionen und andere Vibrionen. Wien. klin. Wochenschr. 1906, No. 11.

Kraus und Russ, Ueber Toxine und Antitoxine des Choleravibrio. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XLV, S. 258.

Laubenheimer, Der Dieudonnésche Blutalkaliagar. Centr. f. Bakt. etc. Bd. 52, S. 294.

Liefmann und Nieter, Ueber die Giftbildung der in El Tor isolierten Cholerastämme. Med. Klin. 1906, 2e Jahrg., No. 10.

v. Loghem, Over een op cholera gelijkende ziekte in Deli. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië. 1909, blz. 628.

v. Loghem, Over tegenstoffen bij Immuniteit. Geneesk. Bladen. 13e reeks, No. IV, V.

v. Loghem, Over uit Rusland afkomstige „cholera-vibrionendragers" te Amsterdam. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1911. Eerste helft, No. 2.

Manson, Tropical diseases, 1909.

Markl, Beitrag zur Kenntnis und Differenzierung choleraähnlicher Vibrionen. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XLII, S. 380.

Mühlens und von Raven, Zur Frage der Hämolysin- und Toxinbildung des Choleravibrio. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. LV, S. 113.

Neufeld und Haendel, Beitrag zur Beurteilung der El Tor-Vibrionen. Arb. a. d. Kais. Ges. Bd. XXVI, S. 536.

Neufeld und Woithe, Ueber elective Choleranährböden, insbesondere den Dieudonnéschen Agar. Arb. a. d. Kais. Ges. Bd. XXXIII, S. 605,

Pergola, Ueber die Isolierung des Choleravibrio. Centr. f. Bakt. etc. Bd. LIV, S. 490.

Petri, Ueber die Verwerthung der rothen Salpetrigsäure-Indolreaktion zur Erkennung der Cholerabakteriën. Arb. a. d. Kais. Ges. Bd. VI. S. 1.

Petruschky, Klin. Jahrb. 1906.

Pfeiffer, Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XVIII, S. 1.

Pfeiffer, Die Differentialdiagnose der Vibrionen der Cholera asiatica mit Hülfe der Immunisierung. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XIX, S. 75.

Pfeiffer, Klin. Jahrb. 1906.

Pfeiffer und Friedberger, Zur Frage der Endotoxine und der Antiendotoxine bei Cholera und Typhus. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XXXXVII, S. 98.

Pfeiffer und Issaeff, Ueber die specifische Bedeutung der Choleraimmunität. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XVII, S. 355.

Prausnitz, Zum gegenwärtigen Stand der Choleradiagnose. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XLIII, S. 239.

Prochnik, Choleravibrionen ohne Cholera. Wiener klin. Wochenschr. 1905, No. 39.

Ruffer, Researches on the bacteriological diagnosis of cholera. Brit. med. journ. 1907, p. 735.

Schumacher, Die Differentialdiagnose von Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen durch Blutagar. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. LIV, S. 65.

Schütze, Berl. klin. Wochenschr. 1907, S. 800.

Semmelink, Geschiedenis der cholera in Oost-Indië voor 1817.

Sineff und Drosdowitch, Prof. Dieudonnés Blutalkaliagar. Centr. f. Bakt. etc. Bd. 52, S. 429.

Stokvis, Eenige proefnemingen met de alkalische bloed-agar-agar van Dieudonné. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1910. Eerste helft No. 2.

Stokvis, Eenige opmerkingen omtrent de epidemiologie der cholera asiatica. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1911. Eerste helft No. 2.

Svenson, Agglutinine und Bakteriolysine im Blut von Cholerakranken. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. LXIV, S. 342.

Tuschinsky, Ueber den Dieudonnéschen Blutalkaliagar C. I Or. Bd. 54, S. 91.

Wladimiroff, Referat ueber die Cholera Centr. f. Bakt. etc. Ref. Bd. XLIV, No. 1 u. 2, S. 1.

Zabolotny, L'épidémie du choléra de 1907 et de 1908 en Russie et les mésures sanitaires. Arch. des sciences biol. St. Petersb. T. 14, 1909. Fasc. 5, p. 453—477.

Zlatogoroff, Zur Frage der Diagnostik der Choleravibrionen. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XLVIII, S. 684.

INLEIDING.

Cholera asiatica is een ziekte, die door hare klinische symptomen niet voldoende wordt gekarakteriseerd.

Met zekerheid kan de diagnose slechts gesteld worden uit epidemiologische gegevens — epidemisch optreden met hooge mortaliteit — of na bacteriologisch onderzoek. Aan de hierbij te volgen methodiek zijn de volgende bladzijden gewijd.

Naar thans algemeen wordt aangenomen, wordt de cholera asiatica veroorzaakt door een bepaalde vibrio en kan zij niet optreden onafhankelijk van deze bacterie. Wij danken deze opvatting, wij mogen wel zeggen, zooals nader zal worden uiteengezet, de kennis van dit feit aan Robert Koch.

Deze werd in het jaar 1883 door de Duitsche regeering naar Egypte gezonden als leider van een kommissie, die de opdracht had de destijds in Egypte heerschende cholera-epidemie te bestudeeren. Sprekende over de kennis van de aetiologie der cholera in dien tijd kon Koch zeggen: „Man kannte eigentlich noch nichts von dem Cholera-Infektionsstoff; man wuszte nicht, wo man ihn suchen sollte, ob er etwa nur im Darmkanal oder im Blut oder sonst irgendwo seinen Sitsz hatte. Man wuszte ferner nicht ob es sich in diesem Falle auch um Bakteriën handeln würde, oder etwa um Sproszpilze, oder dergleichen, oder gar um thierische Parasiten z. B. Amöben".

Bij 't zoeken naar den als aanwezig onderstelden parasiet bepaalde men zich in het begin hoofdzakelijk tot microscopisch onderzoek van materiaal van cholera-lijken afkomstig. De meest

verschillende organen werden onderzocht, ook maag- en darminhoud, urine en bloed. Verder werden ook van braaksel, faeces en urine van cholera-patienten volgens zeer verschillende methodes gekleurde praeparaten gemaakt, die microscopisch werden onderzocht. Tegelijkertijd trachtte men van de nog onbekende microben cultures aan te leggen.

Reeds spoedig ontdekte Koch bij zijn microscopisch onderzoek in den darmwand een bepaalde soort van bacteriën, die regelmatig voorkwamen bij lijken van aan cholera gestorven menschen, terwijl ze niet gevonden werden in de lijken van hen, die aan andere ziekten overleden waren. Reeds den 17den September 1883, een maand nadat de kommissie uit Berlijn vertrokken was, kon Koch uit Alexandrië aan de Duitsche regeering dit bericht zenden. Hij voegde er bij, dat hij reeds een jaar vroeger, dus in 1882, in vier verschillende direct uit Indië ontvangen cholera-darmen dezelfde bacillen had gevonden. Toen meende hij er echter geen bijzondere beteekenis aan te mogen toeschrijven, omdat hij de mogelijkheid dat deze bacillen rottingsbacteriën zouden zijn, niet kon uitsluiten. Nu waren de onderzoekingen gedaan bij versche lijken, waarin nog geen postmortale rotting was opgetreden.

Koch meende nu uit de resultaten van zijn onderzoek de conclusie te mogen trekken, dat er verband bestond tusschen de aanwezigheid der gevonden bacillen en de cholera. Dat de bacillen de oorzaak van de cholera zouden zijn, durfde hij nog niet met zekerheid uitspreken, daar het ook nog mogelijk zou kunnen zijn, dat het cholera-proces het darmslijmvlies zoo verwoest, dat een ook steeds in den gezonden darm aanwezige bacterie gelegenheid krijgt in het slijmvlies te dringen.

Proefnemingen, waarbij men dieren inentte met cholera-materiaal en met reincultures van de gevonden bacillen of ook deze per os inbracht met de bedoeling bij de proefdieren cholera op te wekken, hadden nog geen resultaat gehad.

Daar Koch in Egypte aankwam, toen de cholera-epidemie reeds snel aan het afnemen was en er nu geen materiaal voor

verdere onderzoekingen meer te krijgen was, vroeg hij aan de Duitsche regeering verlof met zijn medewerkers naar Britsch-Indië te mogen gaan om daar zijn onderzoek te voltooien. Zoo kwam de kommissie in December 1883 te Calcutta aan, waar men direct aan het werk toog.

Hier vond men bij 't onderzoek van een lijk afkomstig van een geval van cholera, dat een zeer acuut verloop had gehad, waarbij het onderzoek zeer spoedig na den dood werd verricht, in slijmvlokjes genomen uit den darminhoud de ook in den darmwand gevonden bacillen, door Koch kommabacillen genoemd, bijna in reincultuur. Koch nam aan, dat de in het darmslijmvlies en de in den darminhoud gevonden bacillen identiek waren, daar het microscopisch aspect en de groei in gelatineplaten volkomen gelijk waren bij de in beide genoemde objecten gevonden bacillen.

Door gebruik te maken van de gelatine-plaat vond men verder in den darminhoud van cholera-lijken en in de dejecties van cholera-patienten regelmatig kommabacillen ook waar ze met behulp van het microscoop alleen niet konden worden aangetoond.

In Egypte werden in 't geheel 10 obducties bij cholera-lijken verricht, in Indië 42. Bij de 10 in Egypte onderzochte lijken werden in alle gevallen microscopisch kommabacillen aangetoond. Met de gelatine-methode was men toen nog niet voldoende vertrouwd om de kommabacillen hiermee te isoleeren. Bij alle obducties in Indië werden zoowel microscopisch als door gelatine-cultuur kommabacillen aangetoond, behalve in enkele der laatste gevallen, waar men in typischen darminhoud een bijna zuivere cultuur van kommabacillen vond, zoodat men meende het microscoop te mogen laten beslissen.

In Indië werden ook nog de dejecties van 32 cholerapatienten microscopisch en volgens de gelatine-methode onderzocht. Slechts in één geval, waar men te doen had met reeds vrijwel gebonden ontlasting, zeven à acht dagen na den ziekte-aanval gedeponeerd, werden de kommabacillen gemist. Ten slotte werden de komma-

bacillen nog in de praeparaten van 8 niet onder leiding van Koch verrichte cholera-obducties afkomstig aangetoond.

Nu ging men zoeken of men met 't microscoop en met behulp van de gelatine-methode ook kommabacillen kon vinden onafhankelijk van cholera.

Eerst werden de lijken onderzocht van 30 niet aan cholera, maar vooral aan andere darmaandoeningen, gestorven patienten. De darminhoud werd op dezelfde wijze, waarop men het bij de cholera-lijken gedaan had, zorgvuldig onderzocht, maar in geen enkel geval werden kommabacillen gevonden. Ook faeces van gezonde en zieke menschen, vooral ook van lijders aan dysenterie en diarrhee, werden microscopisch en door 't aanleggen van gelatine-cultures onderzocht, echter zonder dat men kommabacillen vond.

Ook buiten het menschelijk lichaam en zijn excrementen heeft men in Indië naar kommabacillen gezocht. Bijzondere aandacht werd gewijd aan het onderzoek van water genomen uit tanks, badgelegenheden en uit de rivier. Slechts in één tank in een voorstad van Calcutta vond men bacillen, die niet van de bij cholera gevondene te onderscheiden waren. De er omheen wonende menschen gebruikten het water van deze tank om kleeren te wasschen, zich te baden, voor huiselijke doeleinden en volgens sommigen ook wel als drinkwater. Juist onder deze menschen heerschte een kleine cholera-epidemie, zoodat het voor de hand lag verband te zoeken tusschen de gevonden kommabacillen en deze epidemie. Dit was de eenige maal, dat in Indië vibrionen, niet van de bij cholera gevondene te onderscheiden, werden aangetoond buiten 't menschelijk lichaam en zijn uitscheidingen. Wel heeft men nu en dan in het water van een tank gebogen staafjes gevonden, doch deze onderscheidden zich, volgens de mededeelingen der onderzoekers, zoowel door hun groeiwijze in gelatine als door hun microscopisch aspect van de choleravibrionen.

Proeven om bij dieren cholera op te wekken door enting of door voedering met cholera-materiaal mislukten ook in Indië.

Men kon de proefdieren, o. a. apen, niet ziek maken. Alleen wordt vermeld, dat bij injectie van infectieus materiaal in de buikholte van muizen het resultaat niet volkomen negatief was, maar „twijfelachtig".

Op grond van hetgeen bij de vermelde onderzoekingen was gevonden stelde Koch op de eerste cholera-conferentie, die in 1884 in Duitschland werd gehouden, drie mogelijkheden:

1e. Het choleraproces begunstigt den groei van de kommabacillen.

Dan zouden deze reeds van te voren in den darm moeten aanwezig zijn en dus tot de zeer algemeen verspreide bacteriën behooren. Dit nu wordt weersproken door het resultaat van het onderzoek.

2e. Een darmbacterie, die ook bij gezonde menschen voorkomt, verandert onder invloed van de cholera en wordt dan kommabacil.

Zooiets is echter in de geheele bacteriologie tot nog toe niet bekend. Het is een hypothese op geen enkel feit gegrond.

3e. De kommabacillen veroorzaken de cholera.

Koch's conclusie was deze:

„Für mich ist also die Sache erwiesen, dasz die Kommabacillen die Ursache der Cholera sind".

Koch zelf heeft gezegd, dat, wanneer een parasiet: 1e in ieder geval van een ziekte aanwezig is onder omstandigheden, die beantwoorden aan de pathologische veranderingen en het klinische verloop; 2e nooit toevalligerwijze bij eenige andere ziekte wordt ontmoet; 3e in staat is, na reingekweekt te zijn en herhaalde malen te zijn overgeënt, de ziekte bij een gezond organisme over te brengen — men zich niet anders denken kan dan: de parasiet is de oorzaak van die ziekte.

In deze stelling zijn tevens de eischen omschreven aan welke voldaan moet zijn, voordat aan eenig mikro-organisme met betrekking tot eenige ziekte aetiologische beteekenis mag worden toegekend.

Dikwijls is het onmogelijk aan al deze eischen te voldoen.

Daarom is in gevallen, waarin men aan Koch's derde eisch niet kan voldoen het feit, dat men in staat is te bewijzen, dat de tegenstoffen in het bloedserum van lijders aan eenige ziekte gevonden identiek zijn met die, welke in het bloedserum van met reincultures van het verdachte organisme behandelde proefdieren worden aangetroffen, van groote beteekenis.

Dat het echter niet zonder gevaar is het niet al te nauw te nemen met de door Koch gestelde eischen kan door een sprekend voorbeeld worden aangetoond.

De in de laatste jaren verschenen studiën over de aetiologie van de varkenspest of hogcholera, een epidemische ziekte, die dikwijls onder de varkens groote sterfte veroorzaakt, hebben de vroeger algemeen aangenomen leer, volgens welke de zoogenaamde bacil van de hogcholera of bacillus suipestifer de oorzaak zou zijn van deze ziekte geheel omver geworpen. Het bleek, dat door gefiltreerd bloed, waarin de bacillus suipestifer niet meer aanwezig was, van de onder verschijnselen van hogcholera gestorven dieren de ziekte kon worden overgebracht. Ook vond men, dat de bacillus suipestifer een bewoner is van den normalen varkensdarm en bij de varkenspest wel beteekenis heeft, doch slechts een secundaire. Men neemt nu aan, dat onder den invloed van de werking van het pestvirus op het organisme van het varken de in den darm aanwezige bacillus suipestifer zich vermeerdert, door den gelaedeerden darm het lichaam binnendringt en nu een soort van sepsis veroorzaakt.

Met het oog op deze onderzoekingen komt het mij gewenscht voor hier uiteen te zetten op welke gronden wij ook nu nog kunnen vasthouden aan de conclusie waartoe Koch in het jaar 1884 kwam, namelijk dat de door hem ontdekte vibrio de oorzaak is van de cholera asiatica.

In den loop der jaren, die gevolgd zijn op de ontdekking van de vibrio van Koch, zijn er feiten aan het licht gekomen, waardoor de argumenten, die Koch kon aanvoeren voor het aetiologisch verband tusschen zijn kommabacil en cholera, eenigszins verzwakt zijn. Vibrionen volgens de methoden, waar-

over Koch beschikte, niet van choleravibrionen te onderscheiden komen ook voor geheel onafhankelijk van cholera. Zij zijn herhaaldelijk gevonden in wateren, die niet door cholera besmet konden zijn, op plaatsen, waar cholera nooit of in jaren niet was voorgekomen.

Koch vond bij gezonde menschen en in lijken van niet-cholera-patienten nooit choleravibrionen. Toch zijn door latere onderzoekers in deze gevallen herhaaldelijk vibrionen gevonden, die Koch in 1883 voor choleravibrionen had moeten houden, ook wel vibrionen, die, naar den tegenwoordigen stand onzer kennis, werkelijk choleravibrionen zijn.

Hiertegenover staat, dat de biologische reacties ons geleerd hebben, dat er een specifiek verschil bestaat tusschen alle vibrionen gevonden op zulk een plaats of op zulk een tijd, dat verband met cholera was uitgesloten, en echte choleravibrionen, terwijl overal waar echte choleravibrionen gevonden werden, waar geen klinische cholera was, toch de mogelijkheid kon worden aangewezen, dat deze van echte cholerageval len afkomstig waren.

Is ons inzicht in de feiten en dus de argumentatie eenigszins veranderd, de conclusie, waartoe Koch kwam, dat een bepaalde vibrio de oorzaak van de cholera asiatica is, is door de onderzoekingen, die in den loop der jaren zijn verricht, zoozeer bevestigd, dat wat voor Koch nog een op zeer goede gronden berustende overtuiging was („für mich"), nu als bewezen mag worden beschouwd.

Men heeft, nadat Koch de choleravibrio had gevonden, in duizenden gevallen over de geheele wereld in verschillende cholera-epidemiën regelmatig in den darminhoud van cholera-lijken en in de dejecties van cholera-patienten de choleravibrio kunnen aantoonen — ook nadat men zeer scherpe onderscheiding van verwante vormen door de biologische reacties had geleerd —, terwijl door duizenden contrôleonderzoekingen is gebleken, dat dezelfde vibrionen nooit voorkomen bij menschen, die geen gelegenheid gehad hebben zich met cholera te besmetten. Dat

men ook nu en dan choleravibrionen kan vinden bij menschen, die wel gezond zijn, maar daarbij toch gelegenheid gehad hebben om geinfecteerd te worden, kan ons niet bevreemden, daar we weten hoe verschillend de individueele reactie op een zelfde infectie zijn kan. Het kan in geen geval de conclusie wettigen, dat de vibrio van Koch een op zich zelf onschuldig organisme voor den mensch zou zijn, maar leert ons slechts, dat er ook tegenover cholera-infectie naast zeer vatbare en weinig vatbare (klinisch gesproken) onvatbare individuen zijn, of ook, dat de virulentie der cholera-vibrionen voor den mensch door bepaalde invloeden zoo gering kan worden, dat zij niet meer instaat zijn bij den mensch van normale gevoeligheid ziekteverschijnselen op te wekken.

Het is aan vele onderzoekers gelukt met reincultures van choleravibrionen bij dieren verschijnselen op te wekken gelijkende op die van de cholera bij den mensch. We willen deze experimenten echter verder buiten bespreking laten, daar hun waarde achterstaat bij die van de op menschen genomen proeven, waardoor het volledig bewijs is geleverd, dat de vibrio van Koch het ziektebeeld van de cholera asiatica kan verwekken.

De waarde dezer deels opzettelijk, deels ook door onvoorzichtigheid of ongeluk onopzettelijk genomen experimenten, is bijzonder groot, daar ze dikwijls werden genomen op tijden, waarin er ter plaatse geen andere cholera-gevallen waren voorgekomen, terwijl ook daarna niemand meer cholera kreeg. Zoo werd in 't jaar 1884 een arts, die aan den cholera-cursus in het instituut voor infectieziekten te Berlijn deelnam, ziek onder verschijnselen van cholera. Hiervoor kon geen andere verklaring gevonden worden dan infectie met cultures, die Koch uit Indië had meegebracht. In November 1884, toen de infectie plaats had, was er geen cholera in Duitschland en de arts, die toen ziek werd, kon zich op geen andere wijze geïnfecteerd hebben dan met de cultures, waarmede hij werkte.

Zonder opzet infecteerden zich ook in 1893 R. Pfeiffer en E. Pfuhl in het instituut voor infectieziekten bij het doen

van dierproeven. Pfeiffer werd zeer ernstig ziek. Zijn ziekte had het verloop van een cholera-geval van middelmatige heftigheid en nog weken lang (33 dagen vanaf den eersten ziektedag gerekend) werden in zijn defaecaties vibrionen gevonden. Nog zes weken na afloop van zijn ziekte vertoonde het bloedserum van Pfeiffer een zeer duidelijke beschermende werking tegen intraperitoneale cholera-infectie bij cavias. Pfuhl werd slechts licht aangetast, kreeg alleen een niet lang durende diarrhee. In zijn defaecaties kon hij zelf acht dagen lang vibrionen aantoonen, die, wanneer ze in de buikholte van cavias werden ingespoten, de gewone virulentie van choleravibrionen bleken te bezitten. Zijn bloedserum vertoonde geen specifieke immuniseerende eigenschappen tegenover cholera bij cavias. Ook toen was er te Berlijn geen cholera en de eenige verklaring voor deze infecties is een infectie met de laboratorium-cultures, waarmede deze onderzoekers werkten. In 1895 stierf te Hamburg Dr. Oergel, assistent in het hygiënisch instituut, onder verschijnselen van cholera. De eenige aannemelijke verklaring hiervoor was weer een infectie met reincultures, waarmede hij dierproeven had gedaan. Ook toen was er in Hamburg en zelfs in geheel Duitschland geen cholera. De infectie kwam waarschijnlijk tot stand, doordat, zooals Dr. Oergel zelf aangaf, een druppeltje van den inhoud van de buikholte van een cavia, die ingespoten was met choleravibrionen, in den mond van den experimentator kwam. Den volgenden dag werd Dr. Oergel ziek en eenige dagen later stierf hij in coma. De klinische verschijnselen waren braken, diarrhee, kuitkrampen en vox cholerica. De diagnose werd bevestigd door herhaald bacteriologisch onderzoek en obductie. Ook in andere laboratoria zijn eenige malen onopzettelijke infecties voorgekomen met den vibrio van Koch. Bovendien zijn er ook opzettelijk, met de bedoeling om uit te maken welken invloed de vibrio van Koch op den mensch heeft, proeven genomen op menschen. Stricker en Hasterlick brachten cultures, die lang op agar voortgekweekt waren, bij menschen in zonder dat

deze daarna ziek werden. Dat dit negatief resultaat niets bewijst, behoeft geen verder betoog nu we weten, dat er ook tegenover cavias bijna avirulente cultures zijn en nu we de gezonde „cholera-vibrionendragers" kennen. Het meest bekend zijn de proeven, die von Pettenkofer en Emmerich op zichzelf namen, om te bewijzen, dat de vibronen van Koch niet zonder meer in staat zijn het ziektebeeld van de cholera te voorschijn te roepen. Beide onderzoekers maakten eerst hun maagsap alkalisch en dronken daarna water, waaraan kleine hoeveelheden van een versche cholera-cultuur waren toegevoegd. Bij von Pettenkofer traden hevige diarrheeën op echter zonder zware algemeene vergiftigingsverschijnselen. Bij Emmerich ontwikkelde zich echter gedurende den nacht, die op het experiment volgde, een zwaar ziektebeeld geheel gelijkende op een typischen aanval van cholera. De dejecties werden rijstwaterachtig, er was sterk gevoel van zwakte, vox cholerica en urineretentie. Het proces duurde verscheidene dagen en had den onderzoeker bijna het leven gekost.

Metchnikoff deed proeven op menschen met een vibrio, die men in het water van een put te Versailles had gevonden. Zij had alle eigenschappen van de cholera vibrio en gedroeg zich ook bij de dierproef als deze. Naast negatieve kreeg hij ook positieve resultaten. Een persoon die vibrionen had ingenomen zonder voorafgaande neutralisatie van zijn maagsap, kreeg zeer profuse diarrhee en in zijn defaecaties werden vibrionen gevonden identiek met de ingenomene. Zes andere personen namen cultures in, nadat hun maagsap eerst was geneutraliseerd met bicarbonas natricus (1 gram per persoon). Allen kregen diarrhee, terwijl in hunne defaecaties de vibronen konden worden gevonden. De diarrhee duurde van één tot zeven dagen en was in één geval rijstwaterachtig. Slechts in één geval trad echte klinische cholera op. Ook hier werd de vibrionen-emulsie toegediend, nadat één gram bicarbonas natricus was ingenomen. Den volgenden dag trad heftige diarrhee op, weldra gevolgd door rijstwaterachtige dejecties. Braken, krampen, anurie en hypothermie

(36,5 ° C. rectaal) maakten het klassieke beeld van de cholera asiatica compleet. Een ander persoon bij wien hetzelfde experiment werd genomen, alleen met dit verschil, dat hij half zoo veel vibrionen-emulsie innam, bleef gezond.

Deze proefnemingen bewijzen, dat de verschijnselen van cholera asiatica door toediening van reincultures van vibrionen per os kunnen worden te voorschijn geroepen. Daar deze proeven werden genomen in den tijd, toen men de agglutinatie en de proef van PFEIFFER, die tegenwoordig beslist noodzakelijk geacht worden om een vibrio als choleravibrio te herkennen, nog niet kende, zou men kunnen tegenwerpen, dat niet bewezen is, dat men met de vibrio van KOCH te doen had in die gevallen, waarin op het innemen van vibrionen cholera-verschijnselen volgden. Dat men in al die gevallen zou te doen gehad hebben met op choleravibrionen gelijkende vibrionen, die waren geisoleerd uit de dejecties van cholera-patienten, is niet aannemelijk. Bovendien is met zekerheid bewezen, dat de vibrionen, waarmede PFEIFFER zich infecteerde, echte choleravibrionen waren, daar deze zijn bewaard gebleven en later door de proef van PFEIFFER en agglutinatie met hoogwaardig choleraserum als choleravibrionen zijn herkend. Dit geval bewijst dus met zekerheid, dat de vibrio van KOCH in staat is bij den mensch de verschijnselen van cholera asiatica op te wekken.

Nooit is, hoewel hierop bijzonder de aandacht is gevestigd — o. a. door KOLLE en GOTSCHLICH bij hunne uitgebreide onderzoekingen tijdens de cholera-epidemie in Egypte in 1902 —, bij een groep van patienten met cholera-verschijnselen één zelfde vibrio gevonden, die bleek geen vibrio van KOCH te zijn. Er bestaat dus geen grond voor de veronderstelling, dat cholera-epidemiën door meer dan één soort van vibrionen zouden kunnen worden veroorzaakt. Bovendien heeft men, voor zoover bekend is, nooit in menschelijke faeces van gezonden of van zieken afkomstig niet-cholera-vibrionen in reincultuur gevonden. In de overgroote meerderheid der gevallen, die door hen onderzocht werden, vonden KOLLE en GOTSCHLICH vibrionen, die door de

biologische reacties onderling volkomen identiek bleken te zijn en ook identiek waren met vibrionen afkomstig van epidemieën in andere landen en in vroegere jaren.

Zoo blijft het ook nog nadat wij door de biologische reacties een zeer fijne onderscheiding geleerd hebben zeker:

1e. Dat in alle cholera-epidemieën overal op de wereld regelmatig de vibrio van Koch wordt gevonden [1]).

2e. Dat nooit onafhankelijk van deze epidemieën de vibrio van Koch is gevonden [2]).

3e. Dat een reincultuur van de vibrio van Koch het ziektebeeld van de cholera asiatica kan opwekken.

Zoo is dus voldaan aan de bekende eischen, die Koch heeft gesteld, om een organisme de oorzaak van een bepaalde ziekte te mogen noemen.

Bevestigd wordt de aetiologische beteekenis van de vibrio van Koch door de onderzoekingen over de aanwezigheid van antistoffen in het bloedserum van cholera-patienten en -reconvalescenten en door de resultaten van de prophylactische entingen met choleravibrionen.

De agglutineerende en bacteriolytische kracht van het bloedserum van hen, die een cholera-aanval doorstaan hebben, is

---

[1]) Dit wil natuurlijk niet zeggen, dat *in alle gevallen zonder uitzondering*, die men epidemiologisch en klinisch voor cholera moet houden, choleravibrionen zijn gevonden. Vindt men in een geval, waarvan men zeker den samenhang met een cholera-epidemie meent te kunnen aanwijzen geen choleravibrionen, dan kan dit toch niet in strijd geacht worden met de leer, dat de cholera asiatica steeds door de vibrio van Koch wordt veroorzaakt, want: 1e. Kan het onderzoek op verkeerde wijze zijn verricht; 2e. Kan men het onderzoek verrichten op een tijd, waarop de vibrionen, die aanwezig geweest zijn, niet meer kunnen worden aangetoond. Zijn deze beide mogelijkheden uitgesloten, dan kan men nog aannemen, dat men in deze gevallen, die toch immers tot de uitzonderingen behooren, te doen had met een ziekte, waarvan de samenhang met de epidemische cholera slechts schijnbaar was, een ziekte niet veroorzaakt door choleravibrionen, tevens een ziekte waarvan geen cholera-epidemie kan uitgaan, dus met een ziekte, die geen cholera was.

[2]) Over het El Tor-vraagstuk zal later worden gesproken. Het wordt voorloopig geheel buiten beschouwing gelaten.

namelijk gedurende een zekere periode gemiddeld veel hooger, dan die van het bloedserum van hen, die nooit cholera gehad hebben.

Door entingen met choleravibrionen heeft men gunstige resultaten bereikt, hoewel hunne waarde voor de praktijk nog niet volkomen is vastgesteld. Zoo verrichtte Powell entingen bij arbeiders in de theetuinen in Assam. Onder deze arbeiders was gedurende een zeker tijdsverloop de morbiditeit ongeveer zes maal minder, de mortaliteit ongeveer acht maal minder dan bij hun niet ingeënte collegas.

Is het dus zeker, dat de vibrio van Koch de oorzaak is van de cholera-epidemieën, dan is het duidelijk, dat het van het allerhoogste belang is deze overal waar hij voorkomt te kunnen ontdekken om hem te dooden voor hij menschen heeft kunnen infecteeren en ook is het dringend noodig de ziektegevallen door hem veroorzaakt met zekerheid te kunnen onderscheiden van ieder ander ziekteproces, dat onder gelijksoortige verschijnselen verloopt.

Dit laatste nu is uitsluitend door klinisch onderzoek niet mogelijk.

Semmelink, die een historisch overzicht schreef over de cholera in Oost-Indië voor 1817 begint zijn boek met deze woorden: „Ieder geneesheer, die eenige jaren in Nederlandsch-Indië de praktijk uitgeoefend heeft, zal ziektegevallen ontmoet hebben, die zooveel overeenkomst met de echte Aziatische cholera vertoonden, dat hij omtrent de diagnose in twijfel moest verkeeren".

Verder zegt hij: „Onder de ziektevormen van den Indischen Archipel, die met de Cholera Asiatica kunnen verwisseld worden behoort in de eerste plaats de cholera nostras.... Zij moet naar onze opvatting beschouwd worden als een eenvoudige acute maag- en darm-katarrh, die zelden of nooit epidemisch optreedt, tengevolge van verschillende oorzaken ontstaan kan". „.... Behalve de hierboven genoemde vormen van acuten maag- en darmkatarrh, die wij samengevat hebben onder de benaming cholera nostras, komen nu in Nederlandsch Indië

nog verscheidene ziekten voor, die aanleiding kunnen geven tot verwisseling met cholera asiatica, en meer op vergiftiging met malaria berusten. Bij jonge kinderen zijn dit de tusschenpoozende diarrheeën, welke het best wijken voor toediening van chinine en bij volwassenen de verschillende vormen van pernicieuse malariakoortsen, vooral de febris intermittens, algida en cholerica. Deze worden dikwijls gelijktijdig met gevallen van Aziatische cholera waargenomen. De overeenkomst daarmede is soms zoo treffend, dat hij, die dergelijke gevallen gezien heeft, zich niet meer verwonderen zal, dat de cholera asiatica door vele geneesheeren als identisch met deze vormen van pernicieuse malariakoorts wordt beschouwd".

Hübener beschrijft een „choleraähnliche" vorm van vleeschvergiftiging als volgt:

„Stürmischer Beginn mit Erbrechen, Durchfall mit reiswasserähnlichen Stühlen, Leibschmerzen, starker Verfall, grosze Schwäche, kleiner frequenter Puls, Fieber, heftige Wadenschmerzen, Urinverhaltung, eingesunkene Augen, trockene kalte Haut, livide Gesichtsfarbe, kühle Extremitäten, intensives Frösteln. Die Temperatur sinkt meist nach hohem Anstieg unter die Norm oder ist von vornherein subnormal, unter Zunahme der Herzschwäche und Auftreten eines Lungenödems erfolgt dann der Tod meist innerhalb der ersten 24 Stunden".

Van deze vleeschvergiftigingen zegt hij: „Aus alledem ergibt sich, dasz das Zustandekommen einer Fleischvergiftung nicht ein einfacher Vorgang, sondern das Produkt einer Reihe komplizierter Prozesse ist, bei den allerdings die spezifischen Bakterien (der Paratyphus- und Gärtnergruppe) den Hauptanteil haben".

In 1908 en 1909 kwamen in Deli telkens zoogenaamde „sporadische choleragevallen" voor. De klinische verschijnselen wezen op cholera asiatica, maar bij het bacteriologisch onderzoek, dat in het pathologisch laboratorium te Medan werd uitgevoerd, kon in geen dier gevallen de vibrio van Koch worden gevonden. Eenmaal gelukte het aan van Loghem uit den darm en uit de

milt van het cadaver van een aan „pseudo-cholera" bezweken patient de paratyphus-B-bacil te kweeken.

In acht andere gevallen werd een bacil gevonden, die veel overeenkomst had met de gewone coli-bacil, doch zich van deze onderscheidde door haar gedrag tegenover melksuiker, die minder snel (of anders?) werd omgezet dan door b. coli. De acht geisoleerde stammen kwamen onderling overeen en moesten, blijkens het resultaat der gedane agglutinatieproeven, als identiek worden beschouwd. Hoewel in enkele gevallen de bacil ook buiten den darm (milt, lymphklier, gal) werd gevonden, durft VAN LOGHEM haar nog niet als aetiologisch moment der „pseudo-cholera" gevallen in kwestie beschouwen, daar het immers bekend is, dat coli- en paratyphusbacillen zich bij allerlei ziekte-processen, vooral kort voor den dood, in het lichaam kunnen verbreiden. DE HAAN constateerde bij drie patienten, die choleriforme verschijnselen vertoonden, dat bacillus proteus de vermoedelijke oorzaak der ziekte was. Deze patienten herstelden alle drie. Waarschijnlijk had de infectie door middel van verontreinigd voedsel plaats gehad.

Behalve de genoemde ziekten hebben ook nog arsenicum-vergiftiging, bepaalde vormen van peritonitis en vroege stadia van trichinosis aanleiding gegeven tot verwisseling met cholera. [1])

Dikwijls zal dus, wanneer men voor de vraag gesteld wordt „cholera of geen cholera", slechts het bacteriologisch onderzoek kunnen beslissen. Wel mag men aannemen, dat een epidemische diarrhee, waarbij de sterfte meer dan 50 pCt. bedraagt, cholera is, doch dit geeft nog geen besliste zekerheid over ieder afzonderlijk geval en bovendien is het juist met het oog op prophylactische maatregelen van ingrijpenden aard gewenscht een volkomen zekere diagnose te kunnen stellen, wanneer het

---

[1]) Als curiosum zij hier nog een aanhaling uit SEMMELINK aan toegevoegd: „BONTIUS verhaalt, dat hij een hevigen aanval van cholera „per imaginationem" kreeg, nadat hij aan het middagmaal van den Gouverneur-Generaal JAN PIETERSZ. KOEN zijne lippen slechts even gezet had aan het vleesch van een krokodil".

aantal ziektegevallen nog niet zoo groot is, dat men van een epidemie kan spreken.

Zal men nu soms, alleen op klinische gegevens afgaande, geneigd zijn ten onrechte de diagnose cholera asiatica te stellen, hiertegenover staat, dat een geval van echte cholera, dat dus uitgangspunt voor een epidemie zou kunnen zijn, onder zulke lichte verschijnselen kan verloopen, dat men hieruit niet tot de diagnose cholera asiatica zal komen. Zelfs kunnen choleravibrionen zich in den darm ontwikkelen zonder dat ziekteverschijnselen optreden. Zulk een „cholera-vibrionendrager" kan normaal gevormde faeces hebben of zelfs lijden aan constipatie.

Zoo isoleerde VAN LOGHEM in den zomer van 1910 choleravibrionen uit faeces van vier gezonde personen, schepelingen aan boord van schepen komende uit besmet verklaarde Russische havens. Een van deze vier vibrionendragers had eenigszins dunne ontlasting, de andere drie leden aan obstipatie.

Wat nu de beteekenis van deze choleravibrionendragers voor de epidemiologie van de cholera is moet nog nader worden onderzocht. Van belang is het in ieder geval hen te kunnen opsporen, daar we het er tegenwoordig nog voor houden moeten, dat ze een gevaar vormen voor hun omgeving. Sedert de onderzoekingen van KOCH over de verspreiding van typhoïed in Zuidwestelijk Duitschland is het bekend geworden, dat de bacillendragers bij deze ziekte een groote rol spelen voor de verspreiding. Een zoo groote rol als bij de febris typhoïdea zal bij de cholera de bacillendrager zeker niet spelen. Immers bij typhus kent men „Bacillendauerausscheider", die jaren lang, tot 18 jaar toe, bacillen in hun ontlasting hebben, terwijl de mededeeling, dat tijdens de cholera-epidemie van 1909 in Oost-Pruisen bij een patiente 69 dagen lang choleravibrionen konden worden aangetoond in de ontlasting tot nu toe nog bovenaan staat.

Van veel gewicht is het, dat men de diagnose zeker en snel kan stellen. De cholera kan zich zoo snel uitbreiden en verplaatsen, dat een enkele dag uitstel in het nemen van prophylactische maatregelen een groot verlies aan menschenlevens

met zich mee kan brengen. Ook vooral met het oog op het handelsverkeer is het noodig snel een beslist oordeel te kunnen uitspreken. Kan men dit niet doen, dan is dit in de eerste plaats schadelijk voor den handel en lastig voor reizigers en in de tweede plaats wordt het gevaar, dat de wettelijk vastgestelde maatregelen ontdoken zullen worden grooter.

Zoo moet dus ieder, wiens taak het is choleravibrionen aan te toonen, de verschillende in aanmerking komende methodes praktisch kunnen toepassen en weten welke waarde men aan iedere gebruikte methode mag toekennen. Nog te dikwijls stellen klinici een besliste diagnose na onderzoek volgens methodes, die geen zekerheid kunnen geven.

Doel van dit proefschrift is:

1e. De verschillende methodes en onderdeelen van methodes van bacteriologische herkenning van cholera te overzien.

2e. De resultaten mede te deelen van eigen proefnemingen, met bloed-alkali-agar-kweekgronden.

3e. Een bespreking van het El Tor-vraagstuk en van de specificiteit der biologische reacties.

HOOFDSTUK I.

Methodes van onderzoek.

MICROSCOPISCH ONDERZOEK.

Door toepassing van deze methode heeft Koch in 1883 den choleravibrio ontdekt. Nog zouden we bij het stellen van de bacteriologische cholera-diagnose het microscoop niet gaarne missen, al is het onmogelijk alleen met behulp van het microscoop choleravibrionen van verwante vormen te onderscheiden.

A. Gekleurd praeparaat.

Men make uit darminhoud of dejecties een uitstrijkpraeparaatje op een objectglas. De beste kansen om vibrionen te vinden heeft men, wanneer men een slijmvlokje onderzoekt. Men kan verschillende kleurstoffen gebruiken. Een zeer duidelijk praeparaat van reincultures krijgt men, wanneer men, zooals in het laboratorium te Amsterdam gewoonlijk gedaan wordt, ongeveer $^1/_2$ minuut onder zachte verwarming kleurt met 1 pCt. carbol-gentiaan-violet, en daarna onder de kraan afspoelt. Praeparaten, waarin men ook weefsel-elementen kan ontmoeten kleurt men echter liever met verdunde carbolfuchsine.

Zoo kan men al naar de zwaarte van het geval en naar het ziektestadium, waarin men het onderzoek verricht vibrionen vinden, geheel of bijna geheel in reincultuur of vermengd met de gewone darmbacteriën, voornamelijk bacterium coli, en wel in alle verhoudingen tot men met 't microscoop geen vibrionen

meer vinden kan. Vindt men een reincultuur van vibrionen of een mengsel van vibrionen en bacillen, waarin het aantal der vibrionen sterk overweegt, dan liggen de vibrionen dikwijls eigenaardig gerangschikt op plaatsen, waar bij het uitstrijken van het slijmvlokje het slijm in draden werd uitgetrokken. De vibrionen liggen dan namelijk allen in dezelfde richting. Hierop vestigde Koch reeds in 1884 de aandacht en hij vergeleek het zoo gevormde beeld bij dat van een school visschen, die in langzaam stroomend water achter elkaar aan zwemmen. Dit beeld hield Koch voor volkomen kenmerkend voor cholera en nog in 1893 kon hij schrijven, dat hij een ook maar eenigermate hierop gelijkend beeld nooit had gezien in gevallen, waarin uit het verdere onderzoek bleek, dat de patient, die deze vibrionen bij zich droeg, geen lijder was aan Aziatische cholera. Hij meende in 1893 in vele gevallen zoo reeds met het microscoop de diagnose met zekerheid te kunnen stellen, ook zelfs nog in die gevallen, waarin de eigenaardige boven beschreven rangschikking der vibrionen wordt gemist en waarin men naast talrijke onregelmatig verspreide bacteriën, die er als cholera-vibrionen uitzien, slechts bacillen vindt gelijkende op bacterium coli. Pas wanneer men onder 't microscoop een meer gecompliceerd mengsel van bacteriën vindt, zou men de diagnose zoo niet meer met zekerheid kunnen stellen. Echter stelde Koch als voorwaarde om de diagnose alleen na microscopisch onderzoek met zekerheid te kunnen stellen, dat de onderzoeker zeer geoefend zij en een goeden blik hebbe op vormverschil tusschen bacteriën. In de laatste epidemie voor 1893 had men in 't instituut voor infectieziekten te Berlijn in bijna 50 pCt. der gevallen, waarin materiaal werd onderzocht, de diagnose microscopisch (dus na enkele minuten) kunnen stellen. Verder onderzoek bevestigde in deze gevallen steeds de met het microscoop gestelde diagnose.

Tegenwoordig zal wel uit geen bacteriologisch instituut uitsluitend na microscopisch onderzoek een diagnose gepubliceerd worden. Nu wij objectieve zekerheid kunnen krijgen mogen

wij ons niet tevreden stellen met een methode, die slechts in handen van geoefende onderzoekers vertrouwbaar is en ook dan nog tot vergissingen leiden kan. Zeker is het, dat de morphologische kenmerken van de individuen van een vibrionencultuur onvoldoende zijn om daaruit de soort te herkennen. Bij de eene cholera-cultuur vindt men slechts zeer korte individuen met zeer geringe kromming, zoo zelfs, dat men aan de meeste exemplaren niet kan zien, dat men met kommabacillen te doen heeft. De meeste exemplaren zien er uit als korte ovoïde staafjes; velen lijken zelfs op coccen. Hier kan ook de meest geoefende uit het microscopisch beeld niet opmaken, dat men met een reincultuur van vibrionen te doen heeft. Hier tegenover staan de typische cultures, welker individuen bijna allen een fraai gebogen vorm en middelbare lengte vertoonen en die dus dadelijk als vibrionen te herkennen zijn. Ten derde zijn er ook cultures, waarvan de individuen bijzonder lang en slank zijn en daarbij nauwlijks gekromd.

Zijn er dus cholera-cultures, waarin de atypische vormen overwegen, hier tegenover staat, dat er niet-cholera-vibrionen zijn, die volkomen gelijken op typische choleravibrionen.

Waar blijft echter, dat men ook nu nog in zeer vele gevallen, reeds enkele minuten nadat men het materiaal, dat onderzocht moet worden, heeft ontvangen met het microscoop alleen met aan zekerheid grenzende waarschijnlijkheid de diagnose kan stellen. Vindt men in een slijmvlokje van de dejecties van een van cholera verdachte patient vibrionen bijna of geheel in reincultuur, dan heeft men bijna zeker met cholera te doen. Reincultures van typische vibrionen heeft men tot nu toe in de dejecties alleen gevonden bij cholera-patienten. Om dwalingen te vermijden moet men zich er voor wachten de fijne spirillen, die in normale faeces en bij diarrhee vooral in het darmslijm dikwijls in groote hoeveelheid voorkomen met choleravibrionen te verwisselen. Deze spirillen zijn meestal langer, fijner en minder gekromd dan kommabacillen en hebben toegespitste einden. Ze groeien niet op de voor choleravibrionen geschikte agar. Vooral

bij sterk slijmhoudende diarrhee-dejecties, zooals ze bij cholera nostras voorkomen, kan men deze spirillen bijna in reincultuur in de slijmvlokken vinden. Een negatieve diagnose of waarschijnlijkheids-diagnose kan men met het microscoop natuurlijk nooit stellen.

Dat het microscopisch onderzoek van cholera-materiaal nog van veel waarde kan zijn, ook al kan geen verder bacteriologisch onderzoek verricht worden, is dus duidelijk. Medici aan boord van een schip en in 't algemeen zij, die niet voor bacteriologisch onderzoek zijn ingericht en ook geen gelegenheid hebben de hulp van een bacterioloog in te roepen kunnen zoo nog in vele gevallen bijna volkomen zekerheid krijgen.

Verder kan het microscoop ons leeren of koloniën, die op een bepaalden voedingsbodem opgekomen zijn, vibrionen-koloniën zijn of niet. Van de koloniën, die men zoo met het microscoop als vibrionen-koloniën herkent, legt men dan verder reinculturen aan.

Door het onderzoek van Zettnow is gebleken, dat choleravibrionen zonder uitzondering één eindstandige zweepdraad hebben. Hoe beter bewegelijk een cultuur is, bij een des te geringer aantal individuen van deze cultuur mist men dezen zweepdraad. Vibrionen, die meer dan één zweepdraad hebben, zijn geen choleravibrionen. Het omgekeerde is echter niet waar. Niet iedere vibrio met één zweepdraad is een choleravibrio. Daar het kleuren van zweepdraden niet gemakkelijk is en het resultaat volgens deze methode verkregen de moeite niet voldoende beloont, heeft deze zweepdraden kleuring voor de praktijk van de bacteriologische cholera-diagnostiek geen waarde.

B. In den hangenden druppel.

Hierin kan men, wanneer men met cholera te doen heeft, de eigen beweging der vibrionen bestudeeren. Men late zich bij dit onderzoek echter niet verleiden de zoogenaamde Brownsche moleculair-beweging, die men bij bacteriën zonder eigen be-

wegelijkheid (b.v. bij de bac. dysenteriae heel sterk) en ook bij doode deeltjes aantreft, voor eigen beweging aan te zien. Men neme geen eigen beweging aan voor men duidelijk gezien heeft, dat telkens individuen van de plaats, die zij oorspronkelijk innamen, verdwenen zijn en er niet weer terug komen. Is men in twijfel, wat bij minder geoefenden zeer wel kan voorkomen, of een cultuur eigen beweging vertoont of niet, dan kan men deze cultuur door chloroform dooden. Verandert hierdoor de bewegingstoestand der bacteriën in den hangenden druppel niet, dan blijkt hieruit, dat geen eigen beweging bestond, maar men met Brownsche moleculair-beweging te doen had.

Het aspect van een goed bewegelijke vibrionen-cultuur in den hangenden druppel is voor een beginner in de bacteriologie zeker bijzonder interessant, maar het is niet kenmerkend voor choleravibrionen, doch wordt ook bij andere vibrionen gevonden. Voor de diagnostiek heeft de hangende druppel dus weinig waarde.

ONDERZOEK DOOR HET AANLEGGEN VAN CULTURES.

1e. Gelatine-cultuur.

Dit was de methode, waarvan Koch zich in 1883 en 1884 bediende om choleravibrionen uit den darminhoud van lijken en uit de dejecties van patienten te isoleeren. Hij beschrijft deze methode ongeveer als volgt:

Uit den darminhoud van een cholera-lijk, of uit de dejecties van een patient, krijgt men reincultures door een klein slijmvlokje in ± 10 cM³. kweek-gelatine (vleeschwater-pepton-gelatine met 10 pCt. gelatine-gehalte en zwak alkalische reactie) [1]),

[1]) Recept voor de gelatine:

Voeg bij 1000 G. vleeschwater (of Liebig 1 %) 10 G. pepton, 5 G. keukenzout en 100 G. in stukjes geknipte gelatine. Laat nu de gelatine opzwellen. Verwarm het mengsel op het waterbad bij 40 à 50° C. Maak de oplossing zwak alkalisch met carbonas natricus. Voeg het wit van één ei in 50 cM³. water toe. Verhit 5 min. tot 100° C. Filtreer door een warme trechter en verdeel de gelatine in buisjes. Steriliseer door op 5 achtereenvolgende dagen tot 100° C. te verhitten. Is de temperatuur bereikt, dan worden de buisjes

die men eerst door verwarming vloeibaar gemaakt heeft, te brengen en daarin fijn te verdeelen. Het is doelmatig hieruit eerst een tweede en uit het tweede weer een derde buisje te infecteeren, om zeker te zijn, dat men tenminste in één van de buisjes geïsoleerde bacteriën heeft. Men giet den inhoud van de buisjes nu op glas-platen onder een klok (tegenwoordig in de Petrische schaaltjes) uit en zet deze in de broedstoof bij ± 24° C., bij welke temperatuur de gelatine stolt. Ook moet men zorgen voor voldoende vochtigheid van de lucht. Reeds na 24 uur vertoonen zich dan reincultures als kleine puntjes in de gelatine [1]).

In zeer acuut verloopende gevallen, die zeer spoedig worden onderzocht, komen op de platen niet zelden bijna uitsluitend choleravibrionen-koloniën tot ontwikkeling, terwijl deze in die gevallen, waarin reeds dieper gaande veranderingen in den darm opgetreden zijn, of het hoogtestadium van de ziekte overschreden is, min of meer op den achtergrond treden tegenover de koloniën van de gewone darmbacteriën. Steeds echter zijn zij door hun karakteristiek uiterlijk bij zwakke vergrooting gemakkelijk te herkennen en zij kunnen, wanneer zij genoeg geïsoleerd liggen, zonder meer als reincultuur in een nieuw kweekmedium worden overgedragen om verder onderzocht te worden. Na een groeitijd van ± 24 uur in gelatine ziet een cholerakolonie bij zwakke vergrooting er uit als een klein bleek druppeltje, niet geheel cirkelrond, zooals de meeste andere in de gelatine groeiende bacteriën-koloniën, maar met onregelmatig

---

tot den volgenden dag bij kamertemperatuur geplaatst. Vooral de wijze van steriliseeren is van belang, met name voor de tropen. Gelatine, die lang bij hoogere temperatuur gehouden wordt, krijgt een lager smeltpunt. In het pathologisch laboratorium te Medan, waar de gelatine-kweekgrond volgens nevenstaand recept door den heer v. d. Bosch wordt bereid, weerstond (naar Dr. v. Loghem mij meedeelde) de gelatine een temperatuur van 32° C. zonder te smelten.

[1]) Heeft men — wat in vele laboratoria niet het geval is — gelatine, die hooge temperaturen kan verdragen, dan groeien de vibrionen er natuurlijk sneller in en kan men het onderzoek spoediger beëindigen.

begrensde hier en daar ook ruwe of oneffene contour. Reeds zeer vroeg ziet zij er ook een beetje gegranuleerd uit en is zij niet zoo gelijkmatig als koloniën van andere bacteriën. Een donkere rand om de oneffen contour van de scherp ingestelde koloniën wordt veroorzaakt door een juist even begonnen vervloeiing van de gelatine. Wordt de kolonie grooter, dan wordt haar gegranuleerd zijn steeds duidelijker. Ten slotte schijnt zij uit sterk lichtbrekende korreltjes te bestaan, zoodat het er op lijkt of kleine splinters glas zijn opgehoopt. Bij verderen groei wordt de gelatine in de naaste omgeving van de kolonie vloeibaar en deze zinkt een beetje dieper in de gelatine in. Daardoor vormt zich een kleine trechtervormige holte in welker midden de kolonie met het bloote oog als een wit puntje te zien is. De vervloeiing van de gelatine grijpt, wanneer de kolonie voldoende geïsoleerd ligt, zelfs bij dagenlangen groei, nooit zeer ver om zich heen, een eigenschap waardoor de koloniën der choleravibrionen te onderscheiden zijn van die van vele andere bacteriën, die de gelatine vloeibaar maken. Het best kan men het inzinken van de kolonie en de karakteristieke trechtervorming vervolgen, wanneer men met de platinanaald een steekcultuur in gelatine aanlegt. Het ziet er dan uit alsof een luchtbel boven de cholera-kolonie zweefde. Later breidt de vervloeiing zich hoe langer hoe meer uit.

Bij zijne onderzoekingen in 1884 vond Koch in alle gevallen, waarin hij verwachte choleravibrionen te zullen vinden, deze met de gelatine-methode. Hij meende ook, dat de choleravibrionen door de wijze, waarop ze in de gelatine groeien, van alle andere bacteriën te onderscheiden zijn. De gelatineplaat was toen zijn beste diagnosticum en hij was er volkomen over tevreden, daar hij meende er in alle gevallen waarin choleravibrionen aanwezig waren, deze mee te kunnen aantoonen.

Nadat men echter de pepton-keukenzout methode had leeren kennen bleek het, dat deze in gevallen, waarin men met de gelatine-methode geen choleravibrionen meer kon aantoonen nog positieve resultaten gaf, dat het dus noodzakelijk was deze

methode steeds toe te passen wilde men geen gevaar loopen nu en dan ten onrechte een negatieve diagnose te stellen. In 1893 schreef Koch verder over de gelatinemethode ongeveer het volgende:

In de techniek van de gelatine-methode is geen verandering gekomen. Wanneer de gelatine bij te hooge temperatuur gehouden, wordt, of wanneer ze niet deugt, zoodat ze reeds bij 22° C. te week is, maken de cholerakoloniën de gelatine in grooteren omvang dan gewoonlijk vloeibaar en dan lijken ze veel op die der bacteriën van Finkler, waarmede ongeoefenden zich herhaaldelijk hebben vergist. Afwijkingen in de samenstelling van de gelatine, langzame ontwikkeling bij lagere temperatuur kunnen oorzaak zijn van een afwijkend aspect. Hierop moet men geoefend zijn. Oudere laboratorium-cultures hebben ook een min of meer atypischen groei. Bij versche choleravibrionen zag ik slechts éénmaal atypischen groei namelijk geringe neiging om de gelatine vloeibaar te maken en daardoor in het begin meer uitbreiding in de vlakte. In twijfelachtige gevallen verzuime men dus niet ook de andere criteria aan te wenden.

Had dus toen reeds de gelatineplaat veel van haar absolute beteekenis verloren, later werd het hoe langer hoe meer duidelijk, dat de gelatineplaat ons niet in staat stelt choleravibrionen te onderscheiden van alle andere er op gelijkende vibrionen. Zoo is dan de gelatine-plaat nu niet meer als vroeger het souvereine middel ter herkenning van choleravibrionen. De gelatine is wel een medium, waarin men heel goed vibrionenkoloniën van koloniën van andere darmbacteriën, vooral van bacterium coli, kan onderscheiden, maar zij is geen absoluut zeker en vooral geen objectief onderscheidingsmiddel voor vibrionen-koloniën onderling. Wat men noemt „de typische groei in gelatine" is geen vaststaand begrip. Kolle kon zich in het instituut voor infectieziekten te Berlijn, bij het onderzoek van de door Gotschlich uit de epidemie in Egypte van 1902 naar Berlijn gezonden cultures, herhaaldelijk overtuigen, dat geoefende bac-

teriologen, die veel choleracultures hadden gezien, koloniën, die andere even geoefende bacteriologen voor typisch verklaarden, voor atypisch hielden; ook kwam het dikwijls voor, dat bacteriologen van professie zich bij de beoordeeling van vibrionenkoloniën vergisten, dat ze van niet-cholera-koloniën cholera maakten en omgekeerd.

De groeiwijze der choleravibrionen in gelatine is veranderlijk en afhankelijk van kleine afwijkingen in de samenstelling van den kweekgrond, die men niet volkomen in zijn macht heeft. Op platen direct uit faeces of darminhoud aangelegd treft men 't vaakst de „typische kolonie" aan. Daarnaast echter ook zeer dikwijls atypische. Ter determineering van cultures, die reeds eenige malen van den eenen kweekgrond op den anderen zijn overgeënt is de gelatine geheel ongeschikt, daar dan dikwijls een ander type van koloniën, een donkerder type, overweegt, zoodat men, wanneer daarnaast ook de gewone lichtere koloniën aanwezig zijn, zelfs den indruk kan krijgen met een verontreinigde cultuur te doen te hebben.

Ook om choleravibrionen in water aan te toonen is de gelatine-methode niet geschikt, daar er sneller groeiende peptoniseerende watervibrionen zijn, die de gelatine vloeibaar maken, zoodat het onmogelijk wordt de langzamer groeiende choleravibrionen te vinden.

Ook nu kan men met behulp van de kweeking in gelatine nog wel tot een waarschijnlijkheidsdiagnose komen. Wanneer men namelijk uit faeces of darminhoud direct in gelatine ent en hierin vibrionenkoloniën in aanzienlijk aantal opkomen, is het hoogstwaarschijnlijk, dat men met cholera te doen heeft, daar men eigenlijk geen andere darmaandoeningen kent, waarbij vibrionen-koloniën in eenigszins aanzienlijk aantal direct uit den darminhoud of de dejecties in gelatine kunnen worden gekweekt.

In laboratoria, waar men, zooals te Medan, gelatine had, die een temperatuur van 32° C. kon verdragen, werd de gelatine-methode tot voor korten tijd nog zeer geroemd en

geregeld toegepast, voornamelijk omdat zij ons in staat stelt vibrionen-kolonies dadelijk te herkennen. Waar men de gelatine met hoog smeltpunt niet kende, was ze reeds lang weinig in tel, omdat te veel tijd verliep voor men resultaat had. Men mag verwachten, dat de gelatine-plaat, nu de Dieudonné-platen zijn ingevoerd, weldra geheel uit de cholera-diagnostiek zal verdwijnen.

2e. Pepton-keukenzout-cultuur.

Schottelius ontdekte in 1885, dat choleravibrionen in vloeibaren kweekgrond bij lichaamstemperatuur vroeger dan de meeste andere bacteriën aan de oppervlakte komen en hier een vliesje vormen kunnen. Dit berust hierop, dat choleravibrionen veel behoefte hebben aan zuurstof en goed bewegelijk zijn. Dunham ontdekte bij zijn onderzoek over de rood-reactie dat in een steriele oplossing van 1 pCt. pepton en 0,5 pCt. keukenzout choleravibrionen bij 37° C. zich zeer snel vermeerderen. Eerst werd deze ontdekking alleen aangewend om de rood-reactie te doen. Dunbar te Hamburg was de eerste, die de ontdekkingen van Schottelius en Dunham aanwendde voor het aankweeken van choleravibrionen uit objecten, die ongeschikt waren om direct op vaste voedingsbodems te worden geënt. In de oplossing van Dunham hebben de choleravibrionen zeer vroeg een voorsprong. Een slijmvlokje of een platinaoogje van de faeces, die onderzocht moesten worden, werd in deze oplossing gebracht en na 3 tot 6 uur bij 37° C. gestaan te hebben werden van de oppervlakte van deze cultuur gelatineplaten geënt. Ook werd wel een grootere hoeveelheid faeces in een Erlenmeyersche kolf met pepton-oplossing gedaan. Tijdens de epidemieën van 1892 en 1893 kreeg men zoo te Hamburg uitstekende resultaten.

Deze pepton-keukenzout-methode is onmisbaar voor nauwkeurig onderzoek, daar zij dikwijls nog positieve resultaten geeft in gevallen, waarin men met andere methodes geen choleravibrionen meer kan aantoonen. Ook tegenwoordig wordt ze nog, slechts

weinig gewijzigd, algemeen toegepast. De bereiding van de oplossing, die tegenwoordig 't meest gebruikt wordt, is als volgt:

In 1 L. gesteriliseerd gedistilleerd water worden 100 G. peptonum siccum Witte, 100 G. keukenzout, 1 G. kaliumnitraat en 2 G. gekristalliseerde carbonas natricus in de warmte opgelost. Deze oplossing wordt gefiltreerd en gesteriliseerd en daarna tien maal met steriel water verdund.

Nu kan men als volgt te werk gaan:

Men neemt een kolfje met 50 cM^3. peptonoplossing en doet hierin $\pm$ 1 cM^3. van de faeces, die onderzocht moeten worden. Nadat dit kolfje 6 uur, 12 uur, 18 uur en 24 uur in de broedstoof bij 37° C. heeft gestaan neemt men telkens een oogje cultuur van de oppervlakte van de vloeistof zonder het kolfje te schudden en onderzoekt dit onder 't microscoop. Tegelijkertijd ent men op vasten kweekgrond.

Ook wanneer men het onderzoek volkomen volgens dit voorschrift uitvoert, zal men toch nu en dan, niettegenstaande de aanwezigheid van enkele nog levenskrachtige choleravibrionen deze niet kunnen aantoonen. Daarom deed Frosch reeds in 1894 met goed resultaat proeven met groote hoeveelheden materiaal, waarvoor 1 à 2 L. peptonwater noodig was. In 1905 deed Gaffky te Berlijn proefnemingen met 6 van verschillende personen afkomstige darmlissen, waarin hij op de officieele wijze geen choleravibrionen had kunnen aantoonen. Nadat deze darmlissen 12 uur lang in een liter peptonoplossing bij 37° C. hadden gestaan kwamen er in 4 van de 6 gevallen nog choleravibrionen tot ontwikkeling.

Vindt men na 12 uur nog geen ontwikkeling van choleravibrionen, dan kan het toch wel zijn, dat na 24 uur het resultaat positief is. In gevallen waarin het resultaat aanvankelijk negatief is, is dus bearbeiding van een groote hoeveelheid materiaal, herhaald onderzoek en zoo noodig lang laten staan in de broedstoof zeer aan te bevelen.

De pepton-methode moet overal aangewend worden, waar

men niet direct uit de faeces reincultures krijgen kan. Zij dient dan om de choleravibrionen een voorsprong te geven voor andere bacteriën om hen daarna in zuivere kweeking te verkrijgen op vaste voedingsbodems. Voor dit doel is zij ook nu nog onmisbaar.

Ook voor het onderzoek van water op de aanwezigheid van choleravibrionen kan de pepton-methode niet gemist worden. Minstens één liter van het water, dat onderzocht moet worden, wordt met 100 cM³. van de niet verdunde peptonoplossing geschud en dan in kolfjes van 100 cM³. verdeeld. Nadat de kolfjes 8 à 12 uur of ook langer bij 37° C. hebben gestaan, onderzoekt men microscopisch of in de bovenste laag ook vibrionen aanwezig zijn en die kolfjes, die er 't meest verdacht uitzien onderzoekt men verder door aanleggen van nieuwe cultures. Volgens deze methode wordt vanaf 1893, toen Dunbar te Hamburg haar invoerde, het onderzoek van water op choleravibrionen verricht.

3e. Agar-cultuur.

De gewone voedings-agar [1]) is een uitnemende kweekgrond voor choleravibrionen en werd ook reeds spoedig na hunne ontdekking in de bacteriologische diagnostiek ingevoerd. De vibrionencultures op agar hebben niet zulke duidelijke kenmerken, dat men hen direct van die van alle andere bacteriën onderscheiden kan. Ze zijn meer transparant dan die van de meeste andere micro-organismen. Men heeft echter 't microscoop

---

[1]) Recept voor de agar:

Voeg bij 1000 G. vleeschwater (of Liebig 1%) 10 G. pepton en 5 G. keukenzout. Kook de oplossing, filtreer haar en maak haar zwak alkalisch met carbonas natricus. Voeg 15 G. agar-agar (in kleine stukjes) toe. Kook nu 30 min., zeef en laat afkoelen tot beneden 60° C. Voeg eiwit van 1 ei in 50 cM³. water toe. Laat ¾ uur bij 120° C. staan. Laat nu bezinken en snijd den volgenden dag het bezinksel af. Los het kweekmedium weer op en verdeel het in buisjes. Steriliseer nu door op 3 achtereenvolgende dagen tot 100° C. te verwarmen. Laat stollen bij 37° C.

noodig om uit te maken of men met een vibrionenkolonie te doen heeft of niet. Staan de agar-platen in dit opzicht dus achter bij de gelatine-platen, hier tegenover staat, dat men ze bij 37° C. plaatsen kan, bij welke temperatuur de cholera-vibrionen veel sneller groeien dan bij ± 24° C., de temperatuur, die bij aanwending van gelatine-platen gewoonlijk niet overschreden wordt. Versch gegoten agar in een gesloten schaaltje scheidt aan zijn oppervlakte een dunne vloeistoflaag af, die hinderlijk is voor de ontwikkeling van geïsoleerde koloniën. De platen moeten goed gedroogd zijn voor men ze gebruiken kan. Dit krijgt men 't best gedaan door ze ± ½ uur bij 37° C. open in de broedstoof te zetten met de oppervlakte, waarop geënt moet worden, naar beneden gekeerd. Komen op een agar-plaat enkele cholera-koloniën op tusschen vele koloniën van andere bacteriën dan is het heel moeilijk de cholera-koloniën te vinden. Dus is de agar-plaat niet geschikt om geënt te worden met materiaal, waarin maar weinig choleravibrionen voorkomen. Daarom wordt zij bijna uitsluitend gebruikt om uit de pepton-cultuur reincultures te krijgen. Na 8 à 12 uur kan men tamelijk groote geïsoleerde koloniën krijgen, groot genoeg voor het beoogde doel d.i. door microscopisch onderzoek en oriënteerende agglutinatie-proef met groote mate van waarschijnlijkheid vast te stellen of men met cholera-koloniën te doen heeft of niet. Is de groei op de eerst geënte agar-plaat niet voldoende om een definitief resultaat te krijgen, dan kan men een tweede agar-plaat enten om hierop reincultures te kweeken waarmede men de proef van Pfeiffer en de quantitatieve agglutinatie-proef kan doen.

Tot voor kort had de agar-plaat een zeer voorname rol in de cholera-diagnostiek, omdat men met behulp van deze platen het snelst reincultures kon krijgen uit de peptonwater-voorcultuur. Men mag echter verwachten, dat in de toekomst de agar-plaat geheel uit de bacteriologische cholera-diagnostiek zal verdrongen worden door de Dieudonné-plaat, behalve in die gevallen, waarin men niet over versch bloed kan beschikken.

CHOLERA-ROOD-REACTIE.

Deze reactie heeft tegenwoordig voor de herkenning van cholera geen beteekenis meer, maar heeft in de geschiedenis van de cholera-diagnostiek zulk een belangrijke rol gespeeld, dat zij wel vermelding verdient. Ook daarom is de bespreking van deze reactie en van de waarde, die aan haar mag toegekend worden, noodig omdat, naar mij werd meegedeeld, nog wel door medici in Indië de diagnose „cholera" gesteld wordt alleen op de positieve rood-reactie. Ook in het bekende leerboek van Patrick Manson over „Tropical diseases" (druk 1909) wordt van de rood-reactie nog gezegd: „For speedy diagnosis this method is most valuable".

Poehl nam in 1886 bij zijn studiën over de reduceerende werkingen der cholera-bacteriën in de door Koch ingevoerde kweek-gelatine, waaraan bepaalde stoffen waren toegevoegd, een roodkleuring waar, die optrad na toevoeging van zoutzuur. Hij vermoedde door spectroscopisch onderzoek, dat deze kleurstof een skatol-derivaat zou zijn, en nam aan, dat zij werd gevormd onder invloed van het door hem aangetoonde reductievermogen der choleravibrionen. Daar dit werk van Poehl in het begin niet algemeen bekend was geworden konden Bujwid en Dunham in 1887 onafhankelijk van Poehl en van elkander de reactie nog eens ontdekken en publiceeren. Bujwid constateerde, dat reeds in 10 à 12 uur oude bij 37° C. gekweekte bouillon-cultures van choleravibrionen door toevoeging van 5 à 10 pCt. zoutzuur een fraaie, rose-violette kleur optrad. Het zoutzuur kon ook door salpeterzuur of zwavelzuur worden vervangen, terwijl ook in gelatine-cultures de reactie optrad. De cultures van de bacillen van Finkler Prior vertoonden bij deze reactie een dergelijke kleuring, doch deze was volgens Bujwid wel te onderscheiden van de kleuring door choleravibrionen veroorzaakt. In geen enkele andere bacteriën-cultuur kwam, volgens hem, de reactie tot stand. Daarom beval Bujwid haar aan als een specifieke reactie op choleravibrionen.

Dunham gebruikte voor zijn proefnemingen een oplossing, die 1 pCt. pepton en 0,5 pCt. keukenzout bevatte. Hij voerde de reactie als volgt uit: De pepton-keukenzout-oplossing, met choleravibrionen geënt, wordt een nacht in de broedstoof gezet bij 37° C. Daarna laat men voorzichtig geconcentreerd zwavelzuur onder de cultuur loopen. Door het hoogere soortelijk gewicht van het zwavelzuur ontstaat er een grensvlak tusschen de beide vloeistoffen en even boven dit grensvlak treedt een roode zone op. Voerde Dunham de reactie met salpeterzuur uit, dan zag hij ook in cultures van andere bacteriën een roodkleuring optreden. Werd ze echter volgens 't aangegeven voorschrift met zwavelzuur uitgevoerd, dan meende Dunham haar als een specifieke reactie op choleravibrionen te mogen aanbevelen.

Brieger herkende de kleurstof, door hem cholera-rood genoemd als een indol-derivaat. Ali Cohen (1887) toonde aan, dat de aanwezigheid van kleine hoeveelheden nitriet voor het ontstaan van de roode kleurstof noodzakelijk is. Met zuivere minerale zuren gelukte hem de reactie niet, terwijl zij bij aanwezigheid van sporen nitriet in de zuren optrad. Hij vond, dat ook enkele andere bacteriën de reactie geven en dat men dus door middel van deze reactie alleen de choleravibrionen niet met zekerheid kan herkennen.

E. Salkowski ontdekte, ook in 1887, dat de zoogenaamde cholera-rood-reactie niets anders is dan de reeds lang bekende reactie van indol met salpeterig zuur. Mengt men 10 cM³. van een oplossing van indol in water van $\pm$ 0,03‰ met 1 cM³. van een 0,02 pCt. nitrietoplossing en zuurt men dan aan met zwavelzuur, dan treedt een zeer fraaie roodkleuring op door dezelfde kleurstof, die ook bij de cholera-rood-reactie de oplossing kleurt. In de cholera-pepton-cultuur van Dunham toonde Salkowski zoowel indol als nitriet aan. In deze cultures kon hij dan ook met absoluut nitriet-vrije minerale zuren de reactie opwekken. In cultures van sommige rottingsbacteriën in dezelfde oplossing kon hij wel indol, maar geen nitriet aantoonen. Voegde hij hier zwavelzuur toe dan trad de reactie

pas op na toevoeging van verdunde nitriet-oplossing. Daar hij in de steriele pepton-keukenzout-kweekgrond van DUNHAM geen nitriet en ook geen nitraat kon aantoonen, was zijn opvatting deze, dat de choleravibrionen uit afgesplitste ammoniak door oxydatie nitriet zouden vormen. Later toonde PETRI echter aan, dat in cholera-cultures 't nitriet door reductie van nitraten ontstaat, die hij in de gebruikelijke kweekmedia kon aantoonen. SALKOWSKI noemde de waarde van de rood-reactie voor de diagnose reeds zeer twijfelachtig. Het resultaat van al deze bovengenoemde studiën is dus ten slotte dit:

Cholera-vibrionen groeien slechts goed in pepton- of eiwithoudenden kweekgrond. Hierin vormen ze uit eiwit of pepton indol. In de gebruikelijke kweekmedia vindt men bijna steeds sporen van nitraten als verontreinigingen. Zijn deze echter niet aanwezig, dan treedt de reactie niet op, tenzij men salpeterzuur of nitraathoudende andere minerale zuren toevoegt. Indien ze wel aanwezig zijn, dan worden ze door de choleravibrionen tot nitriet gereduceerd en treedt na toevoeging van een mineraal zuur de reactie op. Deze reactie is niet anders dan de nitroso-indol-reactie, die intreedt waar indol, nitriet en mineraal zuur in één oplossing samen aanwezig zijn.

PETRI vond bij zijn onderzoekingen (1890) de rood-reactie bij 100 soorten, niet-cholera-bacteriën. Ook het meerendeel der watervibrionen in de groote verzameling, die DUNBAR indertijd te Hamburg had en die 389 verschillende soorten telde, gaf de rood-reactie. Een specifieke reactie op choleravibrionen is zij dus volstrekt niet en het feit, dat KOCH in 1893 nog kon schrijven, dat geen der tot dien tijd bekende bacteriën, die morphologisch met choleravibrionen konden worden verwisseld, de rood-reactie geven, zoodat deze nog „volle zekerheid" kon geven, laat zich alleen hierdoor verklaren, dat men toen de biologische reacties nog niet kende.

Thans heeft de rood-reactie nog slechts deze, wel zeer geringe waarde, dat men er in sommige gevallen door kan uitmaken,

dat bepaalde vibrionen geen choleravibrionen zijn. Immers de negatieve rood-reactie bewijst, dat men niet met de choleravibrio te doen heeft. De positieve rood-reactie daarentegen bewijst niets. Niet alleen vele vibrionen, maar ook enkele stammen van bact. coli en van proteus vulgaris, die zoo gemakkelijk in een pepton-faeces-buisje kunnen groeien, geven een positieve rood-reactie.

Men voert de reactie uit door enkele druppels zuiver (nitrietvrij) geconcentreerd zwavelzuur bij de cultuur in de bekende peptonoplossing, die ook voor de aankweeking gebruikt wordt, te voegen.

BIOLOGISCHE REACTIES.

1e. Bepaling van de pathogeniteit.

De eerste biologische reacties zijn die geweest, waardoor men de pathogeniteit der vibrionen voor bepaalde diersoorten onderzocht. Reeds lang was bekend, dat cultures van choleravibrionen bij cavias in de buikholte ingespoten toxisch op de proefdieren werken. Door de onderzoekingen van R. Pfeiffer kwam aan het licht, dat het gift voornamelijk aan de lichamen der choleravibrionen gebonden is en dat men slechts dan gelijkmatige resultaten krijgt, wanneer niet vloeibare cultures, maar cultures op vasten voedingsbodem gekweekt in bepaalde hoeveelheid in de buikholte worden ingebracht. Pfeiffer ging als volgt te werk: Men neemt van een op agar gekweekte vibrionencultuur met een oogje, dat ± 1,5 mG. cultuur kan opnemen een vol oogje, verdeelt dit in 1 cM³. gesteriliseerde bouillon en spuit deze suspensie in de buikholte van een cavia van 300 à 350 G. gewicht. Heeft men nu met cholera te doen gehad, dan treden steeds spoedig na de injectie eigenaardige vergiftigingsverschijnselen op, waaronder op den voorgrond treedt een snelle daling van de lichaamstemperatuur, die tenslotte door den dood gevolgd wordt. Deze eigenschap der choleravibrionen hield men vroeger voor specifiek, althans in zooverre, dat Koch in 1893 schreef, dat onder alle gekromde bacteriën, die

bij het stellen van de differentieel diagnose in aanmerking komen, er nog geen gevonden was, die in de aangegeven dosis symptomen veroorzaakte ook maar eenigszins gelijkende op de door choleravibrionen veroorzaakte.

Later bleek echter, dat zeer vele watervibrionen, die door hun morphologische eigenschappen en door cultiveering zeer moeilijk of niet van choleravibrionen te onderscheiden zijn, een zeer hooge pathogeniteit voor cavias bezitten. Aan den anderen kant kunnen onder bepaalde omstandigheden choleravibrionen hunne virulentie verliezen, zoodat in de pathogeniteit tegenover cavias geen specifiek diagnosticum ons is gegeven.

Hetzelfde geldt van de negatieve pathogeniteit tegenover duiven. Echte choleravibrionen zijn niet pathogeen tegenover duiven (bij intramusculaire enting in de borstspier), terwijl er op choleravibrionen gelijkende vibrionen zijn, die wel pathogeen zijn voor duiven. Echter zijn er ook onder deze laatsten, die niet pathogeen zijn voor duiven. Hieruit volgt dus, dat men door middel van deze proef in sommige gevallen wel kan vaststellen, dat een bepaalde vibrio geen choleravibrio is, maar nooit zoo een vibrio als choleravibrio kan herkennen.

De eenige inderdaad specifieke reacties op choleravibrionen zijn de proef van Pfeiffer en de agglutinatie-proef. Hoe groot de behoefte aan zulke geheel specifieke reacties was kon pas blijken, toen men ze algemeen ging toepassen.

Sedert de epidemieën van 1892 en 1893 te Hamburg, die veroorzaakt werden door besmetting van de waterleiding met choleravibrionen, heeft men in het hygiënisch instituut te Hamburg veel werk gemaakt van het onderzoek van water op choleravibrionen. Rivierwater werd onderzocht niet alleen in de omgeving van Hamburg, maar ook op zeer verschillende andere plaatsen in Duitschland. Zoo vond men heel dikwijls vibrionen, die men moeilijk of niet van choleravibrionen kon onderscheiden. Er werden ook zulke op choleravibrionen gelijkende vibrionen gevonden op verschillende plaatsen in Duitschland, waar nooit cholera was geweest en waarvan dan ook later bleek, dat ze geen

choleravibrionen waren. Zoo kreeg men te Hamburg een verzameling van 389 verschillende soorten van water-vibrionen. Het grootste aantal op choleravibrionen gelijkende vibrionen vond men in den zomer en in den herfst, dat is juist in dien tijd, waarin ook de meeste cholera-epidemieën voorkomen. Er schijnt dus tusschen deze watervibrionen en de choleravibrionen een zekere overeenkomst te bestaan in levensvoorwaarden. Daarom hebben we groote behoefte aan middelen om de choleravibrionen scherp te onderscheiden van de anderen. Dit bleek ook nog weer bijzonder bij de onderzoekingen van Kolle en Gotschlich over de Egyptische epidemie van 1902, uit wier publicatie het volgende overgenomen is:

„In de laatste Egyptische epidemie waren van 81 vibrionencultures uit faeces van cholerapatienten of verdachten geïsoleerd 19 geen cholera-cultures. De meeste dezer op choleravibrionen gelijkende vibrionen waren wat betreft grootte, vorm, beweegelijkheid, rood-reactie, groei op agar- en gelatine-platen zeer gelijkend op de echte choleravibrionen. Enkelen waren ook door 't aantal van hun zweepdraden (2, 4, 6), door hun pathogeniteit tegenover duiven en door hun groei op de gelatine-plaat van de echte choleravibrionen te onderscheiden".

En verder:

„In Egypte zijn de voorwaarden voor de ontwikkeling van watervibrionen, vooral in het warme jaargetijde, zeer gunstig. Het kanaalwater wordt ook gedronken en op deze wijze kunnen vibrionen in den darm komen. De darminhoud, die veel opgeloste peptonen bevat, is een goede kweekgrond (vooral onder pathologische verhoudingen, zooals bij het cholera-proces) voor allerlei vibrionen. Past men dan nog de pepton-methode toe, dan mag men dus wel reeds a priori verwachten, dat men bij cholera-patienten wel eens nu en dan toevallig op choleravibrionen gelijkende vibrionen zal vinden".

Vooral na de invoering van de pepton-methode is het dus een besliste eisch geworden, dat men nooit de diagnose „cholera" zal stellen zonder contrôle door de proef van Pfeiffer of de

agglutinatieproef. In gevallen van klinische cholera zijn, voor zoover bekend is, nooit niet-specifieke vibrionen in reincultuur in de faeces gevonden en ook konden ze nooit direct uit de faeces op vaste kweekgronden worden gekweekt in eenigszins aanmerkelijke hoeveelheid. Vooral de invoering van de peptonmethode heeft dus de toepassing van de biologische reacties noodzakelijk gemaakt.

2e. Proef van Pfeiffer.

Bij zijne onderzoekingen over intraperitoneale infectie van cavias met choleravirus vond Pfeiffer, dat bij inspuiting van een voldoende hoeveelheid choleravibrionen de proefdieren onder sterke daling van temperatuur binnen 24 uur aan een acute peritonitis te gronde gingen. Bracht men nog grooter hoeveelheden in, dan stierven de cavias aan een vibrionenseptichaemie. Men kon echter ook levende of gedoode cultures inspuiten in zulk een quantiteit, dat het proefdier bleef leven. Dan ontstaat een actieve immuniteit, die zoo hoog opgevoerd kan worden, dat inspuiting van een veelvoud van de dosis letalis zonder schade wordt verdragen. Ook kan men een passieve immuniteit opwekken door inspuiting van kleine hoeveelheden cholera-immuunserum van dieren of menschen afkomstig.

Issaeff behandelde nu geimmuniseerde en niet-geimmuniseerde dieren naast elkaar met intraperitoneale injecties van choleravibrionen. Daarna tapte hij van tijd tot tijd druppeltjes peritoneaal-exsudaat af en onderzocht dit in den hangenden druppel. In het niet voorbehandelde dier ontwikkelden de vibrionen zich weelderig en bewogen ze zich levendig. In het geimmuniseerde dier zag men hen spoedig onbewegelijk worden, daarna tot kogeltjes opzwellen, tenslotte uiteenvallen tot fijne korreltjes, die langzamerhand geheel worden opgelost.

Door vergelijkend onderzoek met andere vibrionen stelde Pfeiffer de specificiteit van deze reactie vast. Niet-choleravibrionen gedragen zich in de buikholte van tegen cholera geimmuniseerde cavias op dezelfde wijze als in de buikholte

van normale cavias. Pfeiffers onderzoekingen werden bevestigd door uitgebreide experimenten van Dunbar met zijne groote verzameling watervibrionen.

Verder toonde Pfeiffer aan, dat in het bloedserum van tegenover cholera geïmmuniseerde dieren anti-lichamen aanwezig zijn, die een specifieke bacteriëndoodende werking op cholera-vibrionen uitoefenen, terwijl op geen der andere soorten van bacteriën een invloed wordt uitgeoefend sterker dan die, welke het normale serum van de dieren van welke het immuun-serum afkomstig is op die bacteriën uitoefent. De resultaten van zijn onderzoekingen werkte Pfeiffer tenslotte uit tot een methode voor de diagnostiek, die hij in 1894 kon publiceeren.

Pfeiffer immuniseerde cavias door deze eerst te behandelen met subcutane injecties van door chloroformdampen gedoode cholera-agarcultures in doses, die een duidelijke intoxicatie met daling van temperatuur te voorschijn roepen. Deze injecties werden na 10 à 14 dagen opgevolgd door intraperitoneale inspuitingen van levend cholera-virus in stijgende doses onder zorgvuldige contrôle van den toestand der dieren, daar dikwijls marasmus, die door den dood gevolgd wordt, optreedt, wanneer een nieuwe injectie gegeven wordt, terwijl de nadeelige gevolgen van de vorige inspuiting (gewichtsafname) nog niet verdwenen zijn. Zoo had Pfeiffer voor het immuniseeren 3 à 4 maanden noodig. Dan kreeg hij cavias, die, bij een gewicht van 800 G. de intraperitoneale inspuiting van 30 mG. van de meest virulente cholera-cultuur konden verdragen. De bactericide functies zijn bij deze dieren zeer sterk ontwikkeld.

Om nu de sterkte van de werking van het bloedserum van zulk een geimmuniseerde cavia te bepalen ging Pfeiffer uit van een zoogenaamd „normaalvirus" dat is een cholera-cultuur, waarvan 0,4 à 0,2 mG. van de 20 uur oude agar-cultuur juist voldoende is om cavias van 200 G. binnen 24 uur bij intraperitoneale injectie te dooden. Versche, juist uit typische cholera-gevallen geïsoleerde cultures, hebben vaak deze virulentie. Zoo niet, dan kan men in den regel door

dierpassages van cavia op cavia zulk een „normaalvirus" kweeken.

De geringste hoeveelheid serum, die juist voldoende is om 2 mG. (d. i. een „normaaloogje") van het normaalvirus binnen één uur tot oplossing te brengen, wanneer zij in 1 cM^3. bouillon met de cholera-dosis gemengd in de buikholte van jonge cavias van 200 G. gewicht wordt ingespoten noemde Pfeiffer de titer van het serum. Zijn meest werkzame cavia-serum had een titer van $^1/_2$ mG.

Tegenwoordig gebruikt men voor de proef van Pfeiffer konijne-serum. Normale paarde-, geite- en ezel-sera hebben een vrij sterke bacteriolytische werking op choleravibrionen en zijn daarom minder geschikt om er een serum voor de proef van Pfeiffer van te maken. Bij normaal konijne-serum is de bacteriolytische werking zeer gering; dit is dus 't meest geschikt.

De snelste en zekerste methode om een goed werkzaam serum te krijgen is deze, dat men ineens een geheele agarcultuur, die door verwarming bij 60° C. gedurende één uur gedood is, in de buikholte van een konijn inspuit. Dit is de beste wijze van enting. Subcutane inspuiting kan ook worden toegepast. De intraveneuse injectie is minder geschikt. Zoo worden tegelijkertijd meerdere konijnen behandeld. Veertien dagen later wordt het bloed afgetapt. Men krijgt dan ± 40 cM^3. serum van ieder konijn. De zoo verkregen sera worden zorgvuldig gemengd.

Wil men het serum bewaren, dan moet het in het vacuumapparaat worden gedroogd. Vloeibaar serum verliest namelijk spoedig veel van zijn werkzaamheid, terwijl voorzichtig gedroogd serum lang kan worden bewaard, zonder dat zijn kracht vermindert. Is het serum gedroogd, dan wordt het in bruine glazen buisjes, waarvan ieder b.v. 0,2 G. gedroogd serum bevat, ingesmolten. Alle data worden geboekt en op de etiquetten der buisjes aangegeven. Zulk serum wordt in verschillende laboratoria bereid en is in den handel.

Voor contrôleproeven kan men serum van normale konijnen, op dezelfde wijze gedroogd, verkrijgen.

In de techniek van de proef van PFEIFFER is geen belangrijke verandering gekomen sedert zij in 1894 voor 't eerst werd aangegeven.

Men werke steeds met hoogwaardig serum (titer minstens 0,2 mG.) waarvan men zeker weet, dat het volkomen vertrouwbaar is. Is men er niet geheel zeker van met een vertrouwbaar serum te werken, dan moet men contrôleproeven nemen.

Men gebruikt cavias van ongeveer 200 G. gewicht.

Bij het eerste proefdier wordt het tienvoud van de titerdosis (dus 2 mG. van een serum met titer 0,2 mG.) van het serum met één oogje (d. i. ± 2 mG.) van de ongeveer 18 uur oude cultuur, die onderzocht moet worden, opgelost in 1 cM^3. bouillon, in de buikholte gespoten.

Bij een contrôledier wordt dezelfde inspuiting verricht, slechts met weglating van het immuunserum.

De inspuiting geschiedt met een holle naald met afgestompte punt. Vooraf maakt men een insnijding in de huid.

Voor microscopisch onderzoek in den hangenden druppel tapt men 20 minuten en, zoo noodig, ook nog één uur na de inspuiting peritoneaalexsudaat met glascapillairen af.

Men onderzoekt dit exsudaat bij sterke vergrooting.

Is bij het eerste proefdier na 20 min., of op zijn laatst na 1 uur, typische korreltjesvorming en oplossing der vibrionen opgetreden, terwijl bij het contrôledier een groote hoeveelheid levendig bewegelijke vibrionen, die hun vorm goed behouden hebben, aanwezig zijn, dan had men te doen met choleravibrionen.

Heeft bij het contrôledier eveneens oplossing der vibrionen plaats gehad, dan kan men te doen gehad hebben met een avirulente cholera-cultuur of met een eveneens avirulente cultuur van op choleravibrionen gelijkende vibrionen. In dit geval beslist de proef dus niet over het al of niet specifiek karakter der cultuur. Heeft bij het eerste proefdier geen oplossing plaats

gehad, dan heeft men met een niet-choleracultuur te doen gehad.

In Duitschland is van regeeringswege voorgeschreven [1]) bij 't contrôledier slechts $^1/_4$ oogje cultuur in te spuiten. Tegen inspuiting van 1 oogje is echter geen bezwaar. (Gaffky, Klin. Jahrb. 1906) en dit heeft het voordeel, dat men de proef zoo ook nog met wat minder virulente cultures kan doen.

Volgens Pfeiffer, Friedberger en Luerssen is het niet noodig te werken met cultures, die ongeveer 18 uur oud zijn. Friedberger en Luerssen kregen reeds goede resultaten met 7 uur oude agar-cultures. Om zeer vroeg de proef te kunnen doen, spoelden zij een schuin-agar-cultuur af met 2 cM³. physiologische zoutsolutie, waarvan 1 cM³. werd gebruikt voor de eerste proef en 1 cM³. voor de contrôleproef.

Zooals uit het bovengezegde reeds blijkt, is de proef van Pfeiffer niet geschikt om van een avirulente cultuur van vibrionen uit te maken of zij al dan niet een choleravibrionen-cultuur is.

Op de beteekenis hiervan en op de waarde van de proef van Pfeiffer ten opzichte van de agglutinatieproef komen we terug aan het einde van de bespreking der agglutinatieproef.

3e. Agglutinatieproef.

Door verschillende onderzoekers werd in 1889 en de volgende jaren waargenomen, dat wanneer men bacteriën laat groeien in het voor deze bacteriën specifieke immuunserum, deze groote vlokken op den bodem van het buisje vormen en de er boven staande vloeistof geheel helder gelaten wordt, terwijl andere vloeibare kweekmedia gelijkmatig troebel gemaakt worden. Dit verschijnsel 't eerst door Charrin en Roger waargenomen bij pyocyaneus werd later door anderen ook gevonden bij verschillende vibrionen (v. Metchnikoff en Ivanoff) en pneumococcus.

---

[1]) „Anweisung zur Bekämpfung der Cholera", festgestellt in der Sitzung des Bundesrats vom 28 Januar 1904, Amtliche Ausgabe, Berlin 1904.

Bordet ontdekte in 1895, dat een geïnactiveerd verdund immuunserum vibrionen immobiliseert en agglutineert, terwijl een actief immuunserum hen daarna bovendien in korrels doet uiteen vallen. Hij sprak het vermoeden uit, dat men hier met specifieke verschijnselen zou te doen hebben.

Gruber en Durham (1895) hadden onafhankelijk van Bordet waargenomen, dat bacteriën in het voor hen specifieke immuunserum kunnen geagglutineerd worden. Zij waren de eersten, die vaststelden, dat dit verschijnsel tot op zekere hoogte specifiek is. Zij werkten met typhus-, coli- en cholera-cultures en bevalen, met eenig voorbehoud, de agglutinatie aan als middel om op elkaar gelijkende bacteriën bijv. typhus- en colibacillen, choleravibrionen en op deze gelijkende vibrionen van elkaar te onderscheiden.

In de volgende jaren is het gelukt voor zeer vele bacteriën agglutineerende sera te bereiden.

Daar men in het begin nog niet wist, welke dieren het meest geschikt zijn om praktisch bruikbare sera te leveren en vooral ook omdat men werkte met te weinig verdunde sera, kreeg men veel last van niet-specifieke nevenwerkingen en ging men zelfs aan de specificiteit van de reactie twijfelen. Door veler onderzoekingen bleek, dat een hoogwaardig serum d. w. z. een serum, dat nog bij zeer sterke verdunning werkzaam is, het meest geschikt is voor de diagnostiek, ja dat hoogwaardigheid van het serum een besliste eisch is, daar men anders fouten kan maken door 't optreden van niet-specifieke nevenwerkingen op andere, in den regel verwante, bacteriën. Gebruikt men bij cholera een hoogwaardig serum afkomstig van een geschikt dier, dan is de reactie volkomen specifiek.

De praktische bruikbaarheid en strenge specificiteit van de reactie werden bijzonder duidelijk bewezen door de onderzoekingen van Kolle en Gotschlich over choleravibrionen en op deze gelijkende vibrionen geïsoleerd uit faeces van patienten tijdens de epidemie van 1902 in Egypte. Het gelukte hun nooit door entingen met niet-choleravibrionen een serum te bereiden, dat

een specifieken agglutineerenden invloed had op echte cholera-vibrionen. Omgekeerd had een cholera-serum geen sterkeren invloed op niet-choleravibrionen dan het normale serum van de dieren, die ter bereiding van het immuunserum hadden gediend. De resultaten van de proef van PFEIFFER en die van de agglutinatie-proef stemden geheel overeen.

Van een zoogenaamde groep-reactie, d. w. z., dat een serum bereid door entingen met een bepaalde bacterie ook werkt op verwante bacteriën, heeft men bij de cholerasera, die van geschikte dieren afkomstig zijn en welker titer voldoende hoog is opgevoerd, geen last.

Een hoogwaardig agglutineerend serum krijgt men 't best door intraveneuse inspuiting van virulente, versche cultures, die gedood zijn door ze een uur lang op 60° te verwarmen. Wat de diersoort betreft, zoo wordt het konijn het meest geschikt geacht om een specifiek agglutineerend serum te leveren. Het normale serum van konijnen heeft een zeer laag agglutineerend vermogen. Dat van paarden en geiten heeft vaak een veel hooger gehalte aan (normale) agglutininen. Normaal ezel-serum heeft evenals konijne-serum een laag agglutineerend vermogen, maar de behandeling van ezels is niet gemakkelijk.

Men neemt groote, krachtige konijnen en geeft deze met tusschenruimten van 7 dagen in 't geheel drie intraveneuse injecties resp. van 1 oogje, 3 en 5 oogjes. Zeven dagen na de laatste injectie wordt het bloed afgetapt.

Bij ezels en paarden spuit men met tusschenruimten van 7 dagen klimmende doses in. Eerst 1 agarcultuur, daarna 2, 4, 6, 7, 8, 8 en tenslotte 12 agarcultures. Bij paarden kan men zoo de agglutinatiewaarde zeer hoog opvoeren, bijv. tot 1 : 10000. Is dit een voordeel aan het paarde-serum verbonden, toch wordt het door R. PFEIFFER (Klin. Jahrb. 1906) geheel afgekeurd, daar volgens zijn waarnemingen normaal paarde-serum in zeer hooge verdunning choleravibrionen, maar ook andere vibrionen kan agglutineeren en dit zoo tot vergis-

singen aanleiding kan geven. Hij wil voor de agglutinatieproef evenals voor de proef van PFEIFFER slechts konijne-serum.

De agglutininen ondergaan evenals de bacteriolysinen in vloeibaar serum tamelijk snel een dissociatie. Zulk een serum is praktisch gesproken zwakker geworden en niet meer geschikt om choleravibrionen van op deze gelijkende vibrionen te onderscheiden. Het agglutinatieproces verloopt niet meer regelmatig. In voorzichtig gedroogd serum blijft echter het gehalte aan agglutininen maanden lang onveranderd. Lost men dit serum echter weer op, dan moet men het ook spoedig gebruiken, daar het slechts weinige dagen onveranderd blijft. Het drogen geschiedt doordat men het serum in dunne laag uitgiet in vacuo boven ongebluschte kalk. Het gedroogde serum is in bruine toegesmolten glazen buisjes, waarop de titer is aangegeven, in den handel.

Konijne-serum moet minstens een agglutineerend titer van 1 : 2000 hebben, paardeserum een titer van minstens 1 : 5000. De cultures, waarmede men de agglutinatieproef doet, moeten niet ouder zijn dan 18 uur en moeten goed ontwikkeld zijn.

In de praktijk doet men de agglutinatieproef op twee manieren.

a. In den hangenden druppel (orienteerende agglutinatieproef).

Deze dient hoofdzakelijk om op vaste kweekgronden die koloniën uit te zoeken van welke men uit kan gaan om door overenting reincultures te krijgen en ook om reeds een voorloopige diagnose te kunnen stellen op een tijdstip, waarop men nog geen reincultures heeft, die voldoende ontwikkeld zijn om er een quantitatieve agglutinatieproef mee te doen.

b. Quantitatieve agglutinatieproef.

Deze beslist.

a. Orienteerende agglutinatieproef.

Men doet op een dekglaasje een druppeltje physiologische zoutsolutie en daarnaast een druppeltje choleraserum in geschikte verdunning. Wil men slechts een waarschijnlijkheidsdiagnose stellen ter orienteering, dan is een serumverdunning van ±

1 : 100 reeds voldoende, anders neme men sterkere verdunningen, daarbij rekening houdende met de titer van het serum. Eerst in het druppeltje physiologische zoutsolutie, daarna in het serumdruppeltje wrijft men een zeer kleine hoeveelheid van de kolonie, die men onderzoeken wil zoo nauwkeurig mogelijk fijn. Positief is de reactie, wanneer men in de physiologische zoutsolutie de bacteriën tot een gelijkmatige suspensie verwrijven kan, terwijl in het serum agglutinatie optreedt. In den regel is dit bij 't verwrijven reeds macroscopisch te zien. Nu maakt men een praeparaat met uitgehold objectglas en bekijkt de beide druppels bij zwakke vergrooting. Treedt de agglutinatie niet oogenblikkelijk op, dan legge men het praeparaat in de broedstoof bij 37° C. Op zijn laatst na 20 min. moet dan agglutinatie zijn opgetreden, anders is de reactie negatief. Kan men de cultuur in de zoutsolutie niet tot gelijkmatige emulsie verdeelen of treedt ook hierin agglutinatie op, dan kan de proef niet beslissen [1]).

b. Quantitatieve agglutinatieproef.

Men onderzoekt hierbij, bij welke verdunning van het serum nog agglutinatie optreedt.

Een zeer practische methode, in het laboratorium te Amsterdam gebruikelijk, is de volgende:

Men gaat uit van een 4 maal verdund serum en maakt vervolgens door bij 1 druppel hiervan 9 druppels physiologische zoutsolutie te voegen 40 maal verdund serum en op dezelfde wijze uitgaande van het laatste serum een 200 maal verdund serum.

---

[1]) Om in sommige gevallen dadelijk na ontvangst van materiaal een voorloopige diagnose te kunnen stellen heeft Dunbar het volgende voorgeslagen en in sommige gevallen ook met goed succes in praktijk gebracht: Men doet op 2 dekglaasjes telkens één druppel pepton-oplossing en wrijft een klein slijmvlokje uit het verdachte materiaal daarin fijn. Bij de eene druppel voegt men een druppel 50 maal verdund normaal serum, bij de andere een druppel 500 maal verdund hoogwaardig cholera-serum. Zijn choleravibrionen aanwezig, dan verliezen ze in de tweede druppel spoedig hun bewegelijkheid, in de eerste niet.

Nu doet men met een pipet, die zoo gemaakt is, dat 24 druppels uit deze pipet = 1 cM³. is, 1 druppel van het 4 maal verdunde serum in een buisje. Hierbij voegt men 1 cM³. van een homogeen suspensie van bacteriën in physiologische zoutsolutie. Zoo krijgt men de verdunning 1:100. Door op dezelfde wijze bij 1 druppel 40 maal verdund serum en bij 1 druppel 200 maal verdund serum 1 cM³. suspensie te voegen krijgt men de verdunningen 1:1000 en 1:5000. Twee druppels 40 × verdund serum met 1 cM³. suspensie geven de verdunning 1:500 (eigenlijk 1:520), terwijl 2 druppels 200 maal verdund serum met 1 cM³. suspensie de verdunning 1:2500 (eigenl. 1:2600) geven. Zoo krijgt men (met een onnauwkeurigheid, die practisch van geen beteekenis is) op zeer gemakkelijke wijze de verdunningen 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2500 en 1:5000. Ter contrôle zet men naast de buisjes, die serum bevatten, een buisje met suspensie zonder serum. Nu zet men het rekje met de buisjes 1 uur in de broedstoof bij 37° C., waarna men 't resultaat kan beoordeelen. Is agglutinatie opgetreden in de serumbuisjes, ook in de hoogere verdunningen, terwijl de vloeistof in het contrôlebuisje gelijkmatig troebel is gebleven, dan is de reactie positief, dus de onderzochte cultuur een choleracultuur. Treedt geen agglutinatie op in de buisjes, waarin het serum is, dan is de reactie negatief.

Men doet verstandig altijd het serum te onderzoeken, wat men doen kan met behulp van een goed agglutineerbare bekende cholera-cultuur.

De agglutinatieproef is geschikt ter herkenning van al die choleracultures, waarmede men een homogene suspensie kan maken in physiologische zoutsolutie, terwijl men van alle niet-cholera-cultures, die aan dezelfde voorwaarde voldoen, kan vaststellen, dat ze geen choleracultures zijn.

Is aan deze voorwaarde voldaan, dan kan men door middel van de agglutinatieproef, althans voor zoover wij thans weten, de diagnose met zekerheid stellen, zoowel in positieven als in negatieven zin.

De veronderstelling, dat de agglutineerbaarheid van cholera-vibrionen zoo wisselend zou kunnen zijn, dat bijv. een cultuur, die door een specifiek serum tot 1 : 3000 geagglutineerd wordt door 't een of ander proces bijv. door een dierpassage zoo veranderd zou kunnen worden, dat ze door hetzelfde serum nu bijvoorbeeld slechts bij verdunning 1 : 100 of 1 : 50 zou worden geagglutineerd is voor cholera niet bewezen. Kolle en Gotschlich, die hier bijzonder hun aandacht op gericht hebben, namen nooit iets dergelijks waar.

Wel is er echter groot quantitatief verschil in de agglutineerbaarheid der verschillende cholera-stammen. Dit verschil in agglutineerbaarheid is onafhankelijk van de virulentie. Bijna avirulente cultures kunnen een even sterke agglutinabiliteit bezitten als virulente, terwijl bij gelijke virulentie verschil in agglutinabiliteit kan bestaan. Dit verschil in agglutinabiliteit is echter niet zoo sterk, dat de herkenning er onmogelijk door zou worden.

Vergelijken we nu de proef van Pfeiffer en hare concurrente, de quantitatieve agglutinatieproef, met elkaar, dan valt ons in de eerste plaats op, dat de eerste proef veel omslachtiger is, meer technische vaardigheid vereischt dan de tweede en dat er bovendien bij onderzoekingen op groote schaal veel cavias voor moeten worden opgeofferd. In gevallen, waarin men tusschen beide methodes kiezen kan en de agglutinatieproef volkomen zekerheid kan geven, zal men dus in de praktijk deze methode verkiezen en de proef van Pfeiffer achterwege laten.

Oude cultures, die maanden of jaren in het laboratorium van agar op agar zijn voortgekweekt, vertoonen dikwijls in physiologische zoutsolutie een „pseudo-agglutinatie". Deze zou volgens Kolle en Gotschlich berusten op plasmolyse. Het is niet als de echte agglutinatie een voortschrijdend proces. De hoopjes, die zich gevormd hebben, worden niet grooter. Blijven de bacteriën bewegelijk, dan wordt de vloeistof nooit geheel helder. Heel oude laboratorium-cultures

kunnen echter vaak de overdraging van agar in zoutsolutie niet verdragen. Ze verliezen hierbij hun zweepdraad en hiermede hun bewegelijkheid en zakken dan, als alle onbewegelijke bacteriën, naar den bodem. De agglutinatieproef is dus niet geschikt om alle oude laboratorium-cultures te determineeren. Er zijn wel oude laboratorium-cultures met typische agglutinatie, maar dit is geen regel. Dan kan men de proef PFEIFFER doen, maar ook deze laat hier dikwijls in den steek, daar zulke cultures vaak geheel avirulent zijn. Het eenige, wat men in dit geval nog kan doen, is er konijnen of cavias mee immuniseeren om te onderzoeken of het zoo gewonnen serum al of niet agglutineerend werkt op cholera-vibrionen. Zoo herkende DÖNITZ een oude cultuur, „cholera calcutta", die haar virulentie volkomen verloren had, als choleracultuur door er een cavia actief immuun tegenover choleravirus mee te maken.

Zooals reeds besproken is, kan men met behulp van de proef van PFEIFFER geen avirulent geworden choleravibrionen herkennen. In den regel zijn uit menschelijke faeces geïsoleerde cultures virulent genoeg om er de proef van PFEIFFER mee te doen. De virulentie kan echter gering zijn. GOTSCHLICH isoleerde uit menschelijke faeces choleravibrionen, die voor cavias pas dan doodelijk waren, wanneer meer dan $^1/_3$ oogje van een 18 uur oude agarcultuur werd ingespoten. VAN LOGHEM vond te Amsterdam in den zomer van 1910 in de faeces van gezonde, uit Rusland afkomstige, schepelingen choleravibrionen, waarvan $^1/_4$ oogje agarcultuur niet voldoende was een cavia te dooden. Nu kan men met zulke choleravibrionen de proef van PFEIFFER nog wel doen, maar de mogelijkheid bestaat toch ook, dat de virulentie-grens, beneden welke de proef van PFEIFFER niet meer kan gedaan worden, zou worden overschreden. In zulke gevallen zou de agglutinatieproef moeten beslissen. Van meer belang is echter, dat men in vele gevallen van avirulente vibrionen, vooral van die welke in het water gevonden worden, wil weten of het choleravibrionen zijn of niet. Ook in deze gevallen kan alleen de agglutinatieproef beslissen.

Uit het hygiënisch Instituut te Königsberg (directeur R. Pfeiffer) werd in 1905 door Friedberger en Luerssen de mededeeling gedaan, dat bij al de elf tot op dien tijd door hen onderzochte gevallen van cholera bleek, dat jonge reincultures, verkregen door geisoleerde agar-plaat-koloniën op schuin gestolde agar te enten, bij verwrijving in physiologische zoutsolutie sterke vlokvorming vertoonden. Deze pseudo-agglutinatie trad dadelijk op en was in bijna alle gevallen zoo sterk, dat ook een zeer werkzaam immuunserum geen veel sterkere vlokvorming zou kunnen bewerken. Door langer verblijf in de broedstoof verdween deze pseudo-agglutinatie, maar bij verschillende cultures (ook van hetzelfde geval afkomstige) op verschillende tijden. Nadat de cultures 6 à 8 uur in de broedstoof hadden gestaan werd nog steeds pseudo-agglutinatie gevonden. In enkele gevallen nog na 14 à 15 uur. Na langer verblijf in de broedstoof werd nooit meer pseudo-agglutinatie waargenomen.

Bij emulsie in gedistilleerd water treedt zelfs bij cultures, die slechts 6 uur in de broedstoof gestaan hebben, geen pseudo-agglutinatie op. Joos en Friedberger vonden echter, dat men door choleraserum met gedistilleerd water te verdunnen, in plaats van met physiologische zoutsolutie, zijn agglutineerend vermogen tienmaal minder maakt. Bij langer voortkweeken van de cultures buiten het lichaam verdwijnt het verschijnsel der pseudo-agglutinatie langzamerhand.

In al de elf bovengenoemde gevallen kregen Friedberger en Luerssen met de proef van Pfeiffer reeds een zeker resultaat op een tijdstip, waarop de agglutinatieproef nog niet kon worden uitgevoerd. Met ± 7 uur oude cultures op schuingestolde agar konden ze reeds de proef van Pfeiffer doen, terwijl het verschijnsel der pseudo-agglutinatie pas na 11 à 15 uur verdween. Ook R. Pfeiffer zelf deelt mede (Klin. Jahrb. 1906), dat de proef van Pfeiffer in de epidemie van 1905 gelegenheid gaf de diagnose zeker te stellen op een tijdstip, waarop de agglutinatieproef nog geen zuivere resultaten geven kon. Gaffky bericht over 6 gevallen uit dezelfde epidemie.

Voor de orienteerende agglutinatieproef had hij nog last van pseudo-agglutinatie bij cultures, die 10 uur of minder bij 37° C. op agar gegroeid waren. Voor de macroscopische agglutinatieproef stoorde de pseudo-agglutinatie alleen, wanneer de cultures niet ouder dan 6 uur waren.

Volgens deze mededeelingen verdient het dus aanbeveling, wanneer men bij zeer jonge cultures last krijgt van pseudo-agglutinatie, zoo mogelijk de proef van PFEIFFER te doen, of, wanneer men geen bijzondere haast heeft, later de agglutinatie-proef te herhalen met dezelfde cultuur.

In gevallen in welke de diagnose van zeer veel gewicht is, bijv. eerste gevallen van een epidemie of op zich zelf staande gevallen, zal men, ook waar de agglutinatie-proef duidelijke resultaten gaf in positieven zin, zeker goed doen door, naar Duitsch voorschrift, ook daarnaast nog de proef van PFEIFFER te doen.

HOOFDSTUK II.

Bloed-alkali-agar-kweekgronden.

In 1888 deed KITASATO onderzoekingen over den invloed, dien zuren en alkaliën, wanneer zij aan neutrale kweekmedia worden toegevoegd, hebben op de ontwikkeling van typhusbacillen en choleravibrionen.

Hij werkte met bouillon en met kweekgelatine en maakte deze eerst met carbonas natricus volkomen neutraal. Daarna voegde hij verschillende hoeveelheden zuur- en alkali-oplossing toe en entte dan met typhusbacillen of choleravibrionen.

Zoo vond hij, dat choleravibrionen tegenover alle zuren veel minder weerstandsvermogen hebben dan typhusbacillen, dat ze daarentegen het toevoegen van alkaliën veel beter verdragen.

In 1893 stelde ARENS vast, dat de choleravibrio juist een bijzondere voorliefde heeft voor sterk alkalische kweekgronden. Volgens hem was een kweekgrond, waaraan, nadat hij geneutraliseerd was, nog 0,05 à 0,08 pCt. kaliloog was toegevoegd, het best geschikt om er choleravibrionen op te kweeken. Op hetzelfde feit wees HESSE ongeveer tegelijkertijd.

DEYCKE was de eerste, die van deze eigenschap der choleravibrionen, dat zij veel alkali verdragen, heeft gebruik gemaakt om een electief kweekmedium te bereiden.

Zijn alkalialbuminaat-gelatine werd gebruikt bij de kleine cholera-epidemie, die in den herfst van 1893 te Hamburg uitbrak. Hij voegde aan de gelatine 2 à 3 pCt. alkalialbuminaat toe en 1 (later $^2/_3$) pCt. carbonas natricus. Men vindt

aangegeven, dat in dit kweekmedium choleravibrionen zeer welig groeiden, typhusbacillen en watervibrionen [1]) (met uitzondering van vibrio DUNBAR) daarentegen in 't geheel niet en ook colibacillen weinig of niet. Echter kreeg men niet steeds gelijkmatige resultaten. Bovendien was de bereiding van het alkalialbuminaat niet gemakkelijk.

Later, in 1901, verscheen er een publicatie van HEIM, waarin werd medegedeeld, dat men door gekookt bloed aan kweekmedia toe te voegen de ontwikkeling van choleravibrionen en op choleravibrionen gelijkende vibrionen zeer kan bevorderen. Hij bereidde hiermede vloeibare kweekmedia en ook vaste met agar en gelatine.

In 1907 gaf HEIM een recept aan voor een kweekgrond voor pneumococcen, die hij ook voor de choleradiagnostiek aanbeval. Om niet te vervallen in de fout, door de bacteriologen in zijn eigen vaderland begaan, die zijne verdiensten niet voldoende hebben erkend, volge hier de oorspronkelijke mededeeling van HEIM:

„10 g. Hämoglobin werden mit 90 ccm destillierten Wassers und 10 ccm ungefähr 10 pCt. iger Kalilauge versetzt und das Gemisch im strömenden Dampf sterilisiert. Mit der tiefdunkelroten, haltbaren Flüssigkeit kann man jederzeit auch in kleinen Mengen einen brauchbaren Nährboden bereiten: man füllt von jener Lösung in ein Röhrchen mit 7 ccm Nähragar etwa 1 ccm (2 ccm sind zu viel), verflüssigt im siedenden Wasserbade, mischt und läszt schräg erstarren oder gieszt den Inhalt in ein Kulturschälchen. Die ausgesäten Pneumoniecoccen bilden bis 1 mm. grosze Ansiedlungen, die die braunrote Farbe des Substrats in eine grüne oder gelbbraune umwandeln. Auch für andere Bakterien ist das Hämoglobin wachstumsfördernd, z. B. für Typhus-, Friedländersche Bazillen etc., insbesondere für Metschnikoff- und Choleravibrionen, sodasz

[1]) We mogen hier zeker wel een vraagteeken plaatsen, daar men in 1893 immers de biologische reacties nog niet kende.

man den von mir für die Choleradiagnose sehr geeignet befundenen, aber umständlicher zu bereitenden Nährboden mit Blutkuchenwasser nunmehr vorteilhaft durch diesen sehr einfach herzustellenden ersetzen kan." (Deutsche med. Wochenschr. 1907 S. 1587).

Reeds in den kweekgrond van Heim vinden we dus de beide bestanddeelen, waar de electiviteit van de kweekgronden, aan welker bespreking dit hoofdstuk is gewijd, op berust, in de eerste plaats het bloed of het bloed-derivaat, dat den groei der vibrionen bevordert en in de tweede plaats alkali, dat, in bepaalde verhouding toegevoegd, den groei van vele bacteriën belemmert, terwijl de ontwikkeling der choleravibrionen niet wordt geschaad.

Evenals Heim gebruik makende van de beide reeds vermelde eigenschappen der cholera-vibrionen, hun groot weerstandsvermogen tegenover alkali en hun voorliefde voor bloed, heeft Dieudonné een kweekgrond bereid, waarvan gezegd mag worden, dat hij den naam „Elektivnährboden" ten volle verdient. Het recept voor dezen kweekgrond werd in 1909 door Dieudonné gepubliceerd en is als volgt:

Men voegt bijeen gelijke deelen gedefibrineerd runderbloed en normale oplossing van kaliloog. Dit mengsel wordt in den stoom-sterilisator gesteriliseerd. Nu voegt men 30 deelen hiervan bij 70 deelen neutrale, op de gewone wijze bereide, kweek-agar. De bloed-alkali-agar wordt in schalen van Petri uitgegoten. Om de bloed-alkali-agar beter te doen drogen worden de schaaltjes gedurende eenige dagen bij 37° C. gehouden of gedurende 5 minuten bij 60° C.

In den korten tijd, die, sedert Dieudonné het voorschrift voor zijn kweekgrond publiceerde, verloopen is, hebben reeds vele onderzoekers dezen nieuwen kweekgrond gecontroleerd. Sommigen brachten kleine wijzigingen aan, waardoor ze meenden betere resultaten te krijgen. In achterstaande tabel vindt men een overzicht van het resultaat van al deze onderzoekingen, voor zoover ze tot mijn kennis zijn gekomen:

Naam van den onderzoeker.	VOORSCHRIFT.[1])	RESULTAAT.
DIEUDONNÉ.	Als in den tekst aangegeven.	Choleravibrionen groeien welig. B. coli niet of slechts zeer zwak. Uit normale faeces ontwikkelen zich geen koloniën. Uit een mengsel van faeces met choleravibrionen ontwikkelen zich alleen de choleravibrionen (4 verschillende stammen).
HUNTEMÜLLER.	Men steriliseert $^1/_2$ uur in stroomenden stoom. Na 't gieten der platen droogt men deze $^1/_2$ uur bij 60° C. Daarna moeten ze nog minstens 24 u. staan bij kamertemperatuur voor ze geënt kunnen worden.	De in normale faeces voorkomende bacteriën groeien er bijna niet op. Zeer vele oude en versche cholerastammen, die met faeces gemengd worden, groeien er goed op, bijna in reincultuur. Andere niet specifieke vibrionen groeien op dèzelfde wijze als choleravibrionen. Bacillus pyocyaneus groeide steeds matig goed.
LAUBENHEIMER.		Choleravibrionen en op deze gelijkende vibrionen groeiden goed.

[1]) Waar niets vermeld staat, wijkt het voorschrift niet af van het in den tekst vermelde door DIEUDONNÉ oorspronkelijk aangegevene recept.

Naam van den onderzoeker.	VOORSCHRIFT.[1])	RESULTAAT.
HACHLA en HOLOBUT.	Platen eerst 24 uur bij 37° C. gedroogd, daarna nog 24 uur bij kamertemperat. bewaard, daarna pas geënt.	Choleravibrionen en op deze gelijkende vibrionen groeien zeer welig. Bac. typhi en bact. coli niet of heel weinig. Uit normale faeces slechts zeer geringe ontwikkeling van bacteriën. Uit met choleravibrionen gemengde faeces welige ontwikkeling van choleravibrionen bijna in reinculturuur. Paratyphus-bacillen groeien ook.
SINEFF en DROSDOWITCH.	Platen 24 uur bij 37° C. gedroogd. Daarna na korter of langer tijd geënt.	Choleravibrionen en op deze gelijkende vibrionen groeien goed. De groei van bac. typhi, bac. dysenteriae, faeces-ook diarrhee-bacteriën wordt onderdrukt doch niet geheel; wel voldoende om de diagnose te kunnen stellen. De kweekgrond werd met goed gevolg gebruikt voor 't onderzoek van echte cholera-faeces en gaf resultaten, die overeen kwamen met die, welke volgens de pepton-keukenzout-methode werden verkregen.

[1]) Waar niets vermeld staat, wijkt het voorschrift niet af van het in den tekst vermelde door DIEUDONNÉ oorspronkelijk aangegevene recept.

Naam van den onderzoeker.	VOORSCHRIFT. [1])	RESULTAAT.
JACOBSEN.		50 uit water gekweekte op choleravibrionen gelijkende stammen van bacteriën werden op DIEUDONNÉ-platen geënt. In 14 gevallen kwamen flinke op cholera-koloniën gelijkende koloniën op. In de andere gevallen niets of zoo goed als niets.
TUSCHINSKY.	Kweek-agar, die 2 % agar-agar bevatte, werd gebruikt. De platen werden eerst 24 uur bij 37° C. gedroogd.	Onderzoek van echte cholera-faeces. In de meeste gevallen was na ± 12 uur de groei voldoende om de agglutinatieproef te doen en was over-enten overbodig. Bij onderzoek van 39 dejecties, die typisch rijstwaterachtig waren, kreeg hij in de meeste gevallen reincultures, in enkele gevallen onzuivere cultures en in drie gevallen konden geen choleravibrionen worden gevonden. Bij onderzoek van 44 gevallen van niet typische excrementen, waarin vibrionen aanwezig waren: in 20 gevallen reincultures, in 5 gevallen bijna reincultures, in 19 gevallen onreine cultuur.

[1]) Waar niets vermeld staat, wijkt het voorschrift niet af van het in den tekst vermelde door DIEUDONNÉ oorspronkelijk aangegevene recept.

Naam van den onderzoeker.	VOORSCHRIFT.[1])	RESULTAAT.
PERGOLA.	Kweek-agar, die 3 à 4 % agar-agar bevatte, werd gebruikt. De platen werden na 't stollen ½ uur bij 60 à 65° C. geplaatst en ± 24 uur later gebruikt.	Choleravibrionen en op deze gelijkende vibrionen zijn binnen 15 uur zeer goed ontwikkeld. Proteus vulgaris heeft neiging hetzelfde te doen. Typhus- en paratyphus-B-bacillen, bac. enteritidis Gärtner en bact. coli ontwikkelen zich moeilijker en langzamer en hunne koloniën zijn van die van cholera te onderscheiden.
STOKVIS.	Kweek-agar, die ± 5 % agar-agar bevatte, werd gebruikt. De platen werden voor ze geënt werden eerst 24 uur bij 37° C. gehouden. In plaats van runderbloed werd varkensbloed genomen.	Bij enting met kunstmatige cholerafaeces kreeg men alleen groei van choleravibrionen. Proteus vulgaris en bact. coli groeiden wel wanneer ze in reincultuur werden geënt, niet in tegenwoordigheid van cholera en ook niet met elkaar gemengd.
NEUFELD en WOITHE.	Kweek-agar, die 3 % agar-agar bevatte, werd gebruikt. Het bloed-alkali-mengsel werd ¾ à 1 uur gesteriliseerd. De platen werden 15 à 24 uur in de broedstoof bij 37° C. gezet, daarna nog 5 à 10 minuten geheel open in de broedstoof bij 60° C.	Bact. coli groeide nooit. Platen geënt met normale faeces bleven steriel. Uit kunstmatige cholera-faeces groeiden in korten tijd choleravibrionen. Vele watervibrionen groeiden goed. Eenige malen ontwikkelden zich lucht-coccen, éénmaal faeces-coccen.

[1]) Waar niets vermeld staat, wijkt het voorschrift niet af van het in den tekst vermelde door DIEUDONNÉ oorspronkelijk aangegevene recept.

Naam van den onderzoeker.	VOORSCHRIFT. [1])	RESULTAAT.
Esch.	De platen werden eerst $^1/_2$ uur bij 60° C. gedroogd. Daarna stonden ze nog 24 uur bij kamertemperatuur voor ze geënt werden.	Uit kunstmatige cholera-faeces kwamen de gewone faeces-bacteriën bijna heelemaal niet op, choleravibrionen bijna in reincultuur. Pyocyaneus groeide ook flink, maar overwoekerde de platen toch niet geheel.
Bürgers.	De platen werden eerst 2 uur bij 37° C. geplaatst en daarna nog 2 maal 24 uur bij kamertemperatuur bewaard voor ze geënt werden.	Goede resultaten met echte cholera-faeces. Doordat de ontwikkeling van de normale darmflora wordt belemmerd kon men groote hoeveelheden faeces uitstrijken.
Glaser en Hachla.		Proteus vulgaris groeide goed, b. faecalis alkaligenes even goed, soms beter dan de choleravibrio.

[1]) Waar niets vermeld staat, wijkt het voorschrift niet af van het in den tekst vermelde door Dieudonné oorspronkelijk aangegevene recept.

Uit vorenstaand overzicht blijkt, zeer duidelijk, dat DIEUDONNÉ ons een kweekgrond heeft geschonken, uitnemend geschikt voor de isoleering van choleravibrionen, uit een mengsel van bacteriën, met name uit faeces.

Aan den voornaamsten eisch, die aan zulk een kweekgrond moet worden gesteld, is voldaan — choleravibrionen groeien er goed op, de meeste andere bacteriën niet of weinig,

Overal waar men proeven heeft genomen met den nieuwen kweekgrond, heeft hij goed voldaan. Ook in het laboratorium te Amsterdam was men zeer tevreden over de resultaten, die men bij het onderzoek van de faeces der Russische schepelingen, waarover reeds vroeger is gesproken, met den kweekgrond van DIEUDONNÉ kreeg.

Men moet echter enkele voorzorgsmaatregelen nemen en op een paar kleinigheden letten, wil men geen gevaar loopen nu en dan verrast te worden door ongunstig resultaat. Eenige praktische wenken mogen daarom hier een plaats vinden.

Neemt men de gewone 2 pCt. agar, dan blijft het mengsel van agar en bloed-kaliloog ook na stolling erg slap en bewegelijk, daar de agar door toevoeging van de bloed-kaliloog immers wordt verdund. Een zeer geschikte consistentie krijgt de kweekgrond echter, wanneer men de ook voor de Endo-platen gebruikelijke 4 pCt. kweek-agar neemt.

Vervolgens controleere men steeds de reactie van de agar en zorge, dat deze ten opzichte van lakmoes neutraal zij.

Dan is het van belang er op te letten, dat, vóór men platen giet, de agar met de bloed-kaliloog volkomen homogeen gemengd is.

Heeft men de bloed-alkali-agar in schaaltjes gegoten, dan late men deze op een stofvrije plaats geheel open staan tot volkomen stolling is opgetreden. Na ongeveer tien minuten of een kwartier, als de agar goed uitgedampt is, kan men de deksels op de schaaltjes doen en deze in de broedstof zetten. (Men lette ook op de dikte van de in de schaaltjes gegoten laag, daar natuurlijk een dikke laag langer tijd noodig heeft om goed uit te dampen

dan een dunne laag. Daarom is het goed in ieder schaaltje een ongeveer gelijke hoeveelheid [bijv. 15 cM³. in een schaaltje van 10 cM. middellijn] te gieten).

Uit de oorspronkelijke mededeeling van DIEUDONNÉ zou men kunnen opmaken, dat men de platen, nadat ze 5 minuten bij 60° C. gestaan hebben, reeds dadelijk met succes gebruiken kan. Dit is echter niet het geval. Heeft men de platen gegoten, dan zijn ze op zijn vroegst den volgenden dag bruikbaar. Wellicht vindt dit hoofdzakelijk hierin zijn oorzaak, dat cholera-vibrionen, zooals DEELEMAN aantoonde, alkalicarbonaat beter verdragen dan het overeenkomstige hydroxyde. Is nu in den DIEUDONNÉ-kweekgrond nog een overmaat van kaliloog (voor natronloog geldt hetzelfde) aanwezig, dan trekt dit aan de oppervlakte kooldioxyde uit de lucht aan en wordt hierbij omgezet in kaliumcarbonaat. Dit proces verloopt langzaam en schijnt ± 24 u. noodig te hebben voor het ver genoeg gevorderd is, om goeden groei van de choleravibrionen toe te laten. DEELEMAN toonde ook aan, dat b. coli e. a. bacteriën vooral in agar veel minder carbonaat verdragen dan cholera, zoodat meteen verklaard is, dat deze bacteriën ook na de omzetting van hydroxyde in carbonaat nog niet groeien. Wellicht heeft ook verdamping van ammoniak, waarop NEUFELD en WOITHE wijzen, eenigen invloed. Sommige onderzoekers lieten de platen nog langer staan, voor ze werden gebruikt. Dit is echter overbodig. Het eenvoudigst is het, wanneer men de platen tot den volgenden dag, dus ± 24 uur, omgekeerd in de broedstof van 37° zet. Dit is volkomen voldoende. De broedstof van 60° C. is voor het drogen niet noodig. Daar zich soms een kleverige vloeistof afscheidt, die door de lucht af te sluiten het uitdampen van de bloed-alkali-agar zou kunnen beletten, doet men goed tusschen schaal en deksel een stukje filtreerpapier te steken.

Houdt men zich aan de gegeven wenken, dan zal men in den regel voor onaangename verrassingen bewaard blijven.

Welke plaats zal nu de bloed-alkali-agar van DIEUDONNÉ in de cholera-diagnostiek moeten innemen?

In de eerste plaats mag men aannemen, dat zij de agar- en de gelatine-platen geheel zal verdringen [1]), daar de Dieudonné-plaat in staat is ons reincultures te leveren van voldoende ontwikkeling om er de agglutinatie-proef en de proef van Pfeiffer mee te doen op een tijdstip, waarop we met de agar- of de gelatine-plaat werkende nog niet zoo ver zouden kunnen zijn. Verschillende van de reeds genoemde auteurs hebben onderzocht of de agglutinabiliteit en de oplosbaarheid door bacteriolytisch serum in de buikholte van cavias ook anders is bij choleravibrionen, die op Dieudonné-agar zijn gegroeid, dan bij die, welke op gewone agar zijn gekweekt. Vrijwel eenstemmig zijn zij in hun oordeel, dat in den regel de agglutinabiliteit een weinig is verminderd, echter niet van beteekenis. Voor de praktijk is dit niet hinderlijk, vooral niet, wanneer men zijn contrôle-proef doet met choleravibrionen, die ook op Dieudonné-agar zijn gegroeid. De proef van Pfeiffer verliep met op Dieudonné-agar gekweekte choleravibrionen geheel als met die, welke op gewone agar zijn gegroeid.

Zal de kweekgrond van Dieudonné ook de pepton-keukenzout-methode uit de rij der bij de cholera-diagnostiek gebruikelijke hulpmiddelen doen verdwijnen?

Op deze vraag moet een ontkennend antwoord gegeven worden. Wel zal het in zeer vele gevallen mogelijk zijn door de Dieudonné-platen direct met faeces of ander cholera-materiaal te bestrijken, hetzij direct of na overenting, reincultures van choleravibrionen te winnen en zal de pepton-methode in veel meer gevallen dan tot nu toe overbodig zijn, doch daarnaast zullen er steeds gevallen overblijven, waarin men met de Dieudonné-platen alleen geen cholera-vibrionen meer kan vinden, terwijl de pepton-methode nog positieve resultaten geeft. Jacobsen onderzocht hoe lang choleravibrionen in zeewater kunnen blijven leven. Hij gebruikte bij zijn onderzoekingen de pepton-oplossing en de Dieudonné-platen naast elkaar en kon

[1]) Althans waar men Dieudonné-platen ter beschikking heeft, die dadelijk voor gebruik gereed zijn.

nu de choleravibrionen ongeveer een week langer aantoonen, wanneer hij eerst entte in pepton-water dan wanneer hij alleen op de Dieudonné-plaat entte. Men kan trouwens a priori wel verwachten, dat waar het er om gaat enkele weinige en dikwijls ook weinig levenskrachtige vibrionen aan te toonen een vloeibaar medium — ceteris paribus — beter zal voldoen dan een vaste kweekgrond. Voorloopig blijft dus de pepton-keukenzout-methode nog onmisbaar.

Ontvangt men verdacht materiaal, dan brenge men een kleine hoeveelheid hiervan in peptonwater en strijke tegelijkertijd het materiaal over een groote oppervlakte van één of meer Dieudonné-platen uit. Krijgt men dan direct op de Dieudonné-platen vibrionen-kolonies of grootere cultures, geschikt voor agglutinatie-proef of proef van Pfeiffer, dan heeft men de pepton-cultuur niet noodig, heeft men daarentegen met de Dieudonné-platen een negatief resultaat, dan kan men nog trachten door enting van af de oppervlakte van het peptonwater vibrionen te kweeken.

Mag nu van den kweekgrond van Dieudonné gezegd worden, dat hij de proef heeft doorstaan en schitterende resultaten heeft gegeven, dit neemt niet weg, dat tevens gebleken is, dat hem nog enkele gebreken aankleven, die zeer hinderlijk kunnen zijn in de praktijk.

Zijn eerste en voornaamste gebrek is, dat hij pas ongeveer een etmaal nadat hij is bereid voor gebruik geschikt is. Nu kan het voorkomen, dat onverwacht materiaal voor onderzoek naar een laboratorium wordt gezonden, terwijl men geen Dieudonné-platen, die voor gebruik gereed zijn, in voorraad heeft. Dan zal men in zulk een geval zeker in den regel eerder volgens de oude methodes werkende de diagnose kunnen stellen, dan wanneer men 24 uur na aankomst van het materiaal op de Dieudonnéplaten zou enten. In zulk een geval, dat zich toch in de praktijk telkens zal voordoen, heeft men feitelijk niets aan de Dieudonné-platen. Waar het in zulke eerste gevallen, sporadische gevallen (als te Amsterdam in 1909)

of „pseudo-cholera"gevallen juist 't allermeest van belang is snel de diagnose te kunnen stellen, is het een sterk gevoelde behoefte een kweekgrond te hebben, die terstond na de bereiding voor gebruik geschikt is.

Een tweede, zeker veel minder ernstig gebrek, is dat ook de b. pyocyaneus — hoewel niet bijzonder welig — op den kweekgrond van Dieudonné groeit. Crendiropoulo deelt mede, dat men te El Tor soms veel last heeft van den b. pyocyaneus bij 't onderzoek van faeces en meent, dat ook bij 't gebruik van Dieudonné-platen deze moeilijkheid nog niet geheel vervalt.

Verder zijn alle onderzoekers het er over eens, dat vele op choleravibrionen gelijkende vibrionen evengoed als de choleravibrionen zelf op Dieudonné-agar groeien. Nu zal het wel tot de vrome wenschen blijven behooren ooit een kweekgrond te vinden, waarop de vibrio van Koch goed groeit en geen enkele andere vibrio, maar toch is dit het ideaal, dat wij zoo dicht mogelijk moeten trachten te naderen. De kweekgrond, waarop 't kleinste aantal niet-specifieke vibrionen groeit is — ceteris paribus — de beste.

Hiermede zijn de voornaamste gebreken van den kweekgrond van Dieudonné genoemd. Wel zagen sommige onderzoekers ook nu en dan nog andere micro-organismen (proteus vulgaris, paratyphus, faecalis alkaligenes) groeien, doch deze waarnemingen werden niet algemeen bevestigd en hebben, voor zoover mij bekend is, in de praktijk geen aanleiding tot moeilijkheden gegeven.

Het eerste der genoemde gebreken, die den nieuwen kweekgrond aankleven, namelijk, dat Dieudonné-agar op zijn vroegst pas na ongeveer 24 uur voor 't gebruik gereed kan zijn, heeft men op drie verschillende wijzen getracht te verhelpen.

Neufeld en Woithe voegden onmiddellijk voordat het kweekmedium in schalen werd uitgegoten er melkzuur aan toe en wel ± 2 cM^3. melkzuur van 10 pCt. aan 100 cM^3. van den vloeibaren kweekgrond. Volgens hen kan de op deze wijze be-

handelde bloed-alkali-agar dadelijk nadat ze gestold is en eenige minuten in de broedstoof van 60° C. heeft gestaan worden gebruikt. Reeds na 24 à 48 uur was echter de zoo behandelde agar niet meer voor het beoogde doel te gebruiken, daar dan de meeste andere soorten van bacteriën er even goed op groeiden als choleravibrionen. Wat eigenlijk het resultaat was bij direct gebruik wordt niet vermeld.

Om op de door NEUFELD en WOITHE aangegeven wijze zich dadelijk bruikbare platen te kunnen verschaffen zou men steeds een broedstoof, die op 60° C. is ingesteld, ter beschikking moeten hebben. Dit nu is zeker niet altijd in alle bacteriologische laboratoria het geval en in ziekeninrichtingen op plaatsen, waar geen bacteriologisch laboratorium is en praktisch werkzame medici dus zelf het noodige bacteriologisch onderzoek met eenvoudige hulpmiddelen moeten verrichten, kan men natuurlijk niet steeds een broedstoof op 60° C. houden. In zulke gevallen zou men dus eerst een broedstoof op 60° C. moeten instellen, waar ook zoo ongeveer een dag mee heengaat, zoodat het beoogde doel niet wordt bereikt. Bovendien kan men van een kweekgrond, die bezig is de eigenschap, waaraan hij zijn waarde te danken heeft — het electief vermogen — snel te verliezen, moeilijk goede, gelijkmatige resultaten verwachten.

Eigen proefnemingen, waarbij gepoogd werd op de door NEUFELD en WOITHE aangegeven wijze een dadelijk voor gebruik geschikten kweekgrond te bereiden, hadden geen bevredigend resultaat. Choleravibrionen groeiden op deze variatie van den Dieudonné-kweekgrond evenmin als op den volgens 't oorspronkelijke recept bereiden kweekgrond, wanneer ze er spoedig na de bereiding werden opgebracht.

Een andere poging om door eenige variatie in het voorschrift aan te brengen den kweekgrond van DIEUDONNÉ dadelijk voor gebruik geschikt te maken, heeft ESCH gedaan. Hij lost 5 G. haemoglobine (Merck) op in 15 cM^3. van een normale oplossing van natronloog en 15 cM^3. gedistilleerd water. Dit moet onder

verhitting boven de vlam geschieden. Van deze oplossing wordt, nadat ze gedurende één uur in den stoom-sterilisator is gesteriliseerd, 15 cM^3. bij 85 cM^3. neutrale kweek-agar gevoegd en er goed mee gemengd. Nu giet men de haemoglobine-natron-agar in schalen uit en laat deze gedurende een uur geheel open staan. Daarna zijn ze geschikt om met cholera-materiaal geënt te worden.

Zijn de principes, waarop de electieve werking van den kweekgrond van Dieudonné berust, feitelijk reeds door Heim aangegeven, dit geldt nog veel meer van den kweekgrond van Esch.

Heim stelde voor haemoglobine-kaliloog-agar als kweekgrond voor choleravibrionen te gebruiken, Esch wil haemoglobine-natronloog-agar, wat wel heel weinig verschil zal maken, doch neemt de verhoudingen wat anders.

Wat nu de resultaten met dezen kweekgrond verkregen betreft, Esch geeft aan, dat vibrionen, zoowel choleravibrionen als andere, er even goed op groeien als op den Dieudonné-kweekgrond, dat echter de groei van andere bacteriën niet zoo sterk belemmerd wordt door de haemoglobine-alkali-agar als door de bloed-alkali-agar.

Friedrichs, die den kweekgrond van Esch aan een nader onderzoek onderwierp, bevestigt de mededeeling van Esch en kreeg bij enting met kunstmatige pyocyaneus-cholera-faeces resultaten, die slechts weinig verschilden van die, welke met den Dieudonné-kweekgrond verkregen werden. Friedrichs zag echter op den Dieudonné-kweekgrond ook b. pyocyaneus, coccen en zelfs b. coli groeien.

Door eigen onderzoek kan ik de mededeelingen van Esch en Friedrichs in hoofdzaak bevestigen. Werd de kweekgrond spoedig na zijn bereiding met faeces van verschillende patienten, hoofdzakelijk lijdende aan diarrhee, bestreken, dan was den volgenden dag de ontwikkeling van bacteriën uit deze faeces zeer gering, uit kunstmatige cholera-faeces hadden zich flinke cultures ontwikkeld, die door de agglutinatie-proef als cholera-

cultures konden herkend worden. Alle cholera-stammen waren er goed op gegroeid. Was het resultaat dus zeer bevredigend, toch bleek — zooals Esch zelf ook aangeeft — deze kweekgrond niet zoo electief te zijn als de Dieudonné-kweekgrond, daar ook b. coli en b. proteus vulgaris er op groeiden en na 24 uur flinke cultures hadden gevormd, wat ik op den Dieudonné-kweekgrond nooit zag. Ook een niet specifieke vibrio (El Tor 35), die op Dieudonné niet groeide, kwam wel op Esch op.

Esch en Friedrichs geven aan, dat men den kweekgrond ook kan bewaren om hem later te gebruiken. Toen ik mijn platen echter één dag bij kamertemperatuur had laten staan en hen daarna met faeces bestreek, zag ik na 24 u. een sterke ontwikkeling van bacteriën, ongeveer even sterk als die, welke plaats had uit dezelfde faeces, die met choleravibrionen waren vermengd.

De kweekgrond van Esch kan zeker goede diensten bewijzen, wanneer men niet in de gelegenheid is versch bloed te krijgen, daar men immers haemoglobine gemakkelijk in voorraad kan houden.

In de behoefte aan een kweekgrond, die niet voor dien van Dieudonné in electief vermogen onderdoet en toch dadelijk na de bereiding gebruikt kan worden, voorziet hij echter niet.

De derde poging om een kweekgrond te bereiden, die de gebreken van Dieudonné niet heeft en toch electieve eigenschappen bezit, is van Crendiropoulo en Panayotatou. Het door hen gepubliceerde recept voor dezen kweekgrond is als volgt:

Los 5 G. pepton (Witte of Chapoteau) op in 190 cM^3. bronwater. Voeg hierbij 10 cM^3. van een 10 pCt. oplossing van natronloog of, wanneer men pepton Witte heeft gebruikt, liever slechts 8 cM^3. Verwarm het mengsel gedurende 3 à 5 minuten en filtreer het na afkoeling door papier. Steriliseer het filtraat na afkoeling gedurende $^1/_2$ uur bij 100° C. Nu mengt men 4 deelen van deze alkalische pepton met 6 deelen neutrale peptonkeukenzout-agar van de volgende samenstelling: 3 gr. agar-agar,

1 G. pepton, 0.5 G. keukenzout en 100 cM³. water. Dit kweek medium kan men in schalen uitgieten. Het is volgens de samenstellers geschikt om dadelijk geënt te worden en heeft bovendien nog het voordeel, dat men op dit kleurloos medium pyocyaneus-koloniën beter van cholera-koloniën kan onderscheiden dan op den donkeren kweekgrond van DIEUDONNÉ. Eén liter van den kweekgrond van CRENDIROPOULO bevat ongeveer 2 G. hydras natricus terwijl één liter van den Dieudonné-kweekgrond 8.4 G. hydras-kalicus bevat. Er zou dus wel een zeer eigenaardig proces bij de bereiding van den kweekgrond van CRENDIROPOULO moeten plaats grijpen, wanneer zijn electief vermogen zou gelijk staan met dat van den kweekgrond van DIEUDONNÉ.

Het bleek dan ook bij onderzoek, dat al de in zuivere cultuur op den kweekgrond CRENDIROPOULO gebrachte bacteriën (cholera, b. coli, staph. aureus, watervibrio en b. pyocyaneus) er goed op groeiden, het sterkst de staph. aureus. Reeds voor ik met mijn proefnemingen begon, had men in het laboratorium te Amsterdam geconstateerd, dat de kweekgrond van CRENDIROPOULO niet de eigenschappen bezit, die de samenstellers er aan toeschrijven. Wellicht is er een fout ingeslopen, hetzij bij hunne proefnemingen, hetzij in de publicatie.

EIGEN PROEVEN.

Het doel, waarmede ik mijne proeven begon, was in de samenstelling of de bereiding van den kweekgrond van DIEUDONNÉ zulk een wijziging aan te brengen, dat hij spoedig nadat men het kweekmedium in schalen heeft uitgegoten, voor gebruik geschikt is.

Vooraf overtuigde ik er mij herhaaldelijk van, dat choleravibrionen zich niet vermenigvuldigen, wanneer ze op Dieudonnéplaten worden gebracht spoedig nadat deze gestold zijn.

Nu werd een reeks van onderzoekingen verricht, waarbij zuivere cultures van de choleravibrio (Arla), b. coli, b. pyocyaneus, proteus vulgaris, staph. aureus en een watervibrio (Katendrecht β) op de op verschillende wijze bereide platen

werden gebracht. Dit geschiedde zoo, dat van een oogje agarcultuur van deze bacteriën een suspensie werd gemaakt in een weinig physiologische zoutsolutie en daarna een oogje van deze suspensie op de platen, die onderzocht moesten worden, werd uitgestreken. Tegelijkertijd werden contrôle-proeven genomen met gewone Dieudonné-platen, die 24 u. bij 37° hadden gestaan. Voor al mijn proefnemingen — behalve waar dit uitdrukkelijk zal worden vermeld — gebruikte ik varkensbloed, daar Hachla en Holobut aangeven, dat de electieve kracht hierdoor nog hooger wordt, dan wanneer men runderbloed gebruikt en daar ook Stokvis met varkensbloed had gewerkt en hiervan goede resultaten had gezien. Ook voor de ter contrôle telkens weer bereide gewone Dieudonné-platen werd steeds varkensbloed genomen. Bij de op boven beschreven wijze verrichte entingen zag ik steeds op Dieudonné cholera, watervibrio, staph. aureus en b. pyocyaneus goed gegroeid, nadat de platen 24 u. [1]) bij 37° C. hadden gestaan, terwijl van b. coli en b. proteus vulgaris zich geen koloniën ontwikkelden.

De eerste pogingen, die werden gedaan om het beoogde doel te bereiken, bestonden hierin, dat een groote kolf met bloed-alkali-agar volgens Dieudonné werd bereid. Dit kweek-medium werd dan telkens nadat het een dag, twee dagen enz. gestaan had in den stoom-sterilisator gesmolten, een gedeelte werd in schalen uitgegoten en de rest werd weer bewaard. De platen werden steeds dadelijk geënt en ook nadat ze 24 uur bij 37° C. hadden gestaan.

De bedoeling hiervan was om na te gaan of men door de bloed-alkali-agar telkens op te koken niet spoedig een kweekmedium van constante samenstelling zou kunnen krijgen, waarop dadelijk nadat het in schalen uitgegoten en gestold is cholera-vibrionen goed groeien, terwijl de eigenschappen van het

[1]) Waar hier en in 't vervolg gesproken wordt van „24 uur" is steeds bedoeld van den eenen dag tot den volgenden. In den regel stonden de platen van den namiddag van den eersten dag tot den voormiddag van den volgenden dag — dus ± 16 à 20 uur — in de broedstoof.

kweekmedium nu niet meer veranderen noch door verder herhaald opkoken, noch door het staan in de broedstoof van 37° C. Zulk een kolf met bloed-alkali-agar zou in tijden, waarin gedurig cholera-materiaal moet worden onderzocht goede diensten kunnen bewijzen en zeer gemakkelijk te hanteeren zijn. Ook dan echter zou er nog een leemte overgebleven zijn voor gevallen, waarin, nadat in langen tijd niet op choleravibrionen was onderzocht, nu onverwacht materiaal, verdacht van met choleravibrionen besmet te zijn, voor onderzoek werd opgezonden.

Het bleek echter, dat men door het gedurig smelten en lang bewaren van den bloed-alkali-agar niet tot zulk een gewenschten eindtoestand komt. Na herhaald opgesmolten te zijn kan het voedingsmedium wel in zulk een toestand komen, dat choleravibrionen er reeds spoedig nadat de agar gestold is op groeien, doch het proces gaat verder voort, zoodat langzamerhand ook andere bacteriën beter gaan groeien. Ook in de broedstoof van 37° C. veranderen de eigenschappen van den herhaaldelijk gekookten bloed-alkali-agar nog, evenals die van de gewone Dieudonné-platen. Zou men dus een kolf met Dieudonné-agar langen tijd willen gebruiken op de aangegeven wijze, dan krijgt men telkens platen, die een weinig minder electief zijn dan de vorige. Bovendien ontstaan al spoedig, nadat men een paar maal heeft opgesmolten, neerslagen en troebelingen, zoodat de platen er zeer onooglijk uitzien en ook moeielijk met vertrouwen voor een gewichtig onderzoek kunnen worden gebruikt. Ongelijkmatige resultaten en onverwachte verrassingen bleven dan ook niet uit. Daar de electieve kracht van den Dieudonné-agar door een enkele maal smelten slechts uiterst weinig vermindert, kan men dit wel doen, doch men kan met een kolf, die telkens opgesmolten wordt, niet lang werken.

Toen het gedurig opsmelten van den gewonen Dieudonné-agar geen bevredigende resultaten opleverde, werd de kaliloog vervangen door natronloog van 4 pCt. (normaal) en van 5,6 pCt.

Ook nu bleef het kweekmedium niet homogeen en doorschijnend, maar werd spoedig troebel. Het beste resultaat had ik nog met een kolf bloed-natronloog-agar, (5,6 pCt. natronloog), waarop nadat hij zesmaal gedurende een $^1/_2$ uur was opgesmolten choleravibrionen dadelijk groeiden. Nog acht maal daarna werd dezelfde agar opgesmolten en dadelijk geënt. Choleravibrionen groeiden er dadelijk goed op, behalve éénmaal, toen niets was opgekomen. Staph. aureus, b. coli en b. pyocyaneus groeiden in 't geheel niet, een watervibrio eerst niet, later weinig en ten slotte ook goed. Uit het groeien van de watervibrio blijkt, dat de eigenschappen van den kweekgrond onder invloed van het koken toch nog telkens veranderden.

Het gelukte mij niettegenstaande langdurige proefnemingen niet met het herhaald opsmelten bevredigende resultaten te krijgen. Van een kweekgrond voor bacteriën moet men toch in de eerste plaats verlangen, dat hij homogeen zal zijn en dat zijn eigenschappen niet veranderlijk zijn onder den invloed van factoren, die men niet in zijn macht heeft. Aan deze beide eischen voldoet herhaaldelijk opgesmolten bloed-alkali-agar niet.

Nu werd een poging gedaan om het kweekmedium, door het dadelijk nadat bloed-alkali en agar zijn gemengd nog langer in den stoom-sterilisator te laten staan, voor directe enting geschikt te maken. Het resultaat van deze proef (dat na 24 uur werd beoordeeld) is in de volgende tabel overzichtelijk weergegeven.

Men ziet uit de tabel, dat op bloed-alkali-agar, die lang gekookt heeft, reeds spoedig na het stollen cholera-vibrionen met succes geënt kunnen worden, terwijl sommige andere bacteriën er niet op groeien. Hebben zoo bereide platen nog 24 u. bij 37° C. gestaan, dan is het electief vermogen echter verdwenen. Door langdurig koken worden dus de electieve eigenschappen van bloed-alkali-agar langzamerhand minder.

De platen, gegoten van agar, die $2^1/_2$ uur gekookt had, waren nog helder en doorschijnend, daarna begon steeds sterker

TABEL I. [1])

Bloed-kaliloog gedurende één uur gesteriliseerd en daarna met agar gemengd (3:7). Platen gegoten, kweekmedium weer i/d sterilisator en telkens na ½ uur platen gegoten.					
DUUR VAN HET STERILISEEREN.	BACTERIËN WAARMEDE GEËNT IS.				
(Zelfde midd. geënt).	cholera	coli	staph. aur.	water-vibrio	pyocy-aneus
1 uur	—	—	—	—	—
1½ uur	—	—	—	—	—
2 uur	—	—	—	—	+— —
2½ uur	Resultaat niet te controleeren door afscheiding van strooperig vocht.				
3 uur	—	—	—	—	—
3½ uur	+	—	—	+—	+
4 uur	+	—	—	+	+— —
4½ uur	+	—	—	+	+— —
(Na 24 u. bij 37° C. geënt).					
1 uur	+	(—)		+	+
1½ uur	+	+		+	+
2 uur	+	+		+	+
2½ uur	+	+		+	+
3 uur	+	+		+	+
3½ uur	+	+		+	+
4 uur	+	+		+	+
4½ uur	+	+		+	+

[1]) Voor de verklaring der teekens zie blz. 76.

wordende troebeling in de bloed-alkali-agar op te treden. Deze troebelingen en neerslagen doen vreezen voor ongelijkmatige resultaten. Bij een volgende proef groeiden dan ook choleravibrionen zoo goed als niet op een kweekgrond, die bijna 4 uur gekookt had. Ik kan dan ook, daar het procédé te langdurig is en 't resultaat te onzeker, een herhaling van deze proeven niet aanbevelen.

Toen langdurige proeven met natron- en kaliloog en herhaaldelijk opsmelten nog niet tot bevredigende resultaten hadden geleid, trachtte ik tot mijn doel te komen door de kaliloogoplossing te vervangen door een oplossing van carbonas natricus. Hiertoe kwam ik naar aanleiding van de proeven van Deeleman, die heeft bewezen, dat choleravibrionen vooral in agar-kweekgronden veel meer soda dan natronloog verdragen.

Toen ik nu geheel volgens 't voorschrift van Dieudonné, doch de kaliloog vervangende door soda-oplossingen van zeer verschillende sterkte, trachtte bloed-soda-agar platen te bereiden, mislukte dit in de meeste gevallen, daar het bloed-soda mengsel bij koken stolsels vormde en dus geen goede menging kon verkregen worden. Enkele bloed-soda mengels leverden echter bruikbare platen, hoewel ze niet zoo helder waren als de gewone Dieudonné-platen.

Het bleek nu toen de kweekgrond, waarin de kaliloog was vervangen door een oplossing van 11,4 pCt. soda, spoedig na stolling werd geënt, dat den volgenden dag de choleravibrio goed was gegroeid, terwijl b. pyocyaneus en b. coli in 't geheel niet, staph. aureus en een watervibrio slechts zeer weinig tot ontwikkeling waren gekomen.

Is de vroeger gegeven verklaring van het feit, dat de Dieudonné-kweekgrond gedurende het eerste etmaal onbruikbaar is, de juiste, dan is meteen verklaard waarom de soda-variatie dadelijk bruikbaar is. Immers de overmaat van alkali is hier geen hydroxyde maar carbonaat en men heeft hier dus dadelijk dezelfde verhoudingen, die bij de met kali- of natronloog bereide platen pas na verloop van tijd ontstaan.

Daar bij het steriliseeren van het bloed-soda mengsel zich dikwijls een weinig van het materiaal aan den wand van het kolfje vastzet en men zoo den indruk krijgt niet nauwkeurig te werken — hoewel dit niet zoo sterk was dat de resultaten er merkbaar onder leden — werd later het bloed-soda mengsel niet gesteriliseerd, doch eenigen tijd in een broedstoof van 45° C. geplaatst en daarna gemengd met agar, die tot ± 45° C. was afgekoeld. Toevalligerwijze tot deze bereidingsmethode gekomen, zag ik hiervan goede resultaten. Men krijgt zoo platen die er fraai uitzien. Ze zijn licht-rood, helder en doorschijnend. Nadat ze een dag bij 37° C. hebben gestaan, zijn ze echter meer donker van kleur geworden. Daar de resultaten goed waren, zette ik gedurende eenigen tijd het onderzoek voort met den op de aangegeven wijze bereiden kweekgrond. Later bleek mij echter bij vergelijking, dat men geheel dezelfde resultaten krijgt, wanneer men het bloed-soda-mengsel koud mengt met den kokenden agar. In 't laatste geval behoeft de agar niet af te koelen en is men dus spoediger klaar. Daar de resultaten dezelfde zijn, is dus de laatste methode als de eenvoudigste en minst tijdroovende 't meest aan te bevelen.

Verder onderzoek had ten doel na te gaan:

1°. Hoe de verschillende in het laboratorium aanwezige cholera- en niet-choleravibrionen zich gedragen op den kweekgrond van Dieudonné en op soda-variaties van verschillend soda-gehalte.

2°. Hoe verschillende andere bacteriën zich op deze kweekgronden gedragen.

3°. Wat het resultaat is bij enting met faeces van gezonde en zieke personen, voornamelijk van lijders aan diarrhee.

4°. Wat het resultaat is wanneer men deze faeces mengt met choleravibrionen of met b. pyocyaneus en dan ent.

Het resultaat van al deze proefnemingen is neergelegd in tabel II en III.

Tabel II geeft een overzicht over de onderzoekingen met bacteriën in zuivere cultuur, terwijl in tabel III de resultaten

van de proeven met faeces en kunstmatige cholera- en pyocyaneus-faeces zijn weergegeven.

Voor het onderzoek werden gebruikt:

8 niet-vibrionen-stammen,
11 cholera-stammen,
2 El-Tor-stammen,
5 niet-cholera vibrionen-stammen.

De 13 cholera- en El tor-stammen waren:

Arla 6, Arla 11, Arla 18, Hebe 13 } Door VAN LOGHEM in Augustus 1910 uit de faeces van gezonde schepelingen uit Petersburg afkomstig geïsoleerd

Kral, O. P. Groningen } Sinds jaren in de collectie van het Hygiënisch Instituut te Amsterdam aanwezig.

20. Uit cholera-epidemie Sumatra's O.K. 1906—1908. Patholog. lab. Medan.

Medan. Uit cholera-epidemie Sumatra's O.K. 1910. Patholog. lab. Medan.

Mekka. Gekweekt uit Mekkaganger. Ontvangen van CRENDIROPOULO (Alexandrië).

Van Dongen. Uit 't eenige cholerageval in 1909 te Amsterdam voorgekomen. STOKVIS.

El Tor a_1, El Tor a_2 } El Tor-vibrionen in 1909 van CRENDIROPOULO uit Alexandrië ontvangen.

De 5 niet specifieke vibrionen-stammen waren:

El Tor 10, El Tor 35 } Van CRENDIROPOULO uit Alexandrië.

Katendrecht α, Katendrecht β } Door den Amsterdamschen gezondheids-dienst in 1909 in het water gevonden.

Dunbar. Uit de literatuur bekend.

De faeces waarmede werd gewerkt zijn in de tabel door letters aangeduid. Ze waren telkens van verschillende personen, patiënten in het Wilhelmina Gasthuis, afkomstig (met een enkele uitzondering, wanneer ik na verloop van eenigen tijd

weer faeces ontving van een patiënt, van wien ik ook vroeger al faeces had gehad).

A = normale faeces.
B = „ „
C = faeces van lijder aan diarrhee.
D = „ „ „ „ „
E = „ „ „ „ „
F = „ „ „ „ „
G = „ „ „ „ chronische dyspepsie (brokkelig).
H = „ „ „ „ diarrhee.
I = „ „ „ „ „
J = zalfachtige faeces van lijder aan chronische dyspepsie.
K = faeces van lijder aan diarrhee.
L = „ „ „ „ „
M = „ „ „ „ „
N = „ „ „ „ „

De bereiding van den kweekgrond werd in den loop van het onderzoek gewijzigd, zooals reeds is vermeld. De verschillende bereidingswijzen zijn aangegeven door de cijfers: I, II en III.

I beteekent:

Kweekgrond geheel volgens 't voorschrift van DIEUDONNÉ bereid, doch de kaliloog vervangen door een oplossing van soda.

II beteekent:

Gelijke deelen gedefibrineerd bloed en soda-oplossing gemengd. Het mengsel eenigen tijd verwarmd in de broedstoof van 45° C. De gesmolten agar afgekoeld tot ± 45° C. Bloed-soda en agar gemengd in verhouding 3 : 7 [1]).

III beteekent:

Gelijke deelen gedefibrineerd bloed en soda-oplossing gemengd en het koude mengsel met agar van 100° C. gemengd in verhouding 3 : 7 [1]).

---

[1]) Men menge *zeer zorgvuldig*, zoodat de platen een volkomen homogeen aspect vertoonen.

Het soda-gehalte van de gebruikte oplossingen is steeds in de tabellen aangegeven.

Contrôle-proeven werden genomen met „Dieudonné" d. w. z. platen geheel volgens 't voorschrift van DIEUDONNÉ bereid en niet geënt voordat ze 24 u. bij 37° C. hadden gestaan. Ook vindt men in de tabellen 't resultaat van een proef met „Esch" d. w. z. een kweekgrond bereid volgens 't vroeger vermelde voorschrift van ESCH.

Voor al de verschillende kweekgronden werd steeds varkensbloed gebruikt (behalve een enkele maal geitebloed, waar dit is aangegeven) en kweek-agar die 4 pCt. agar-agar bevatte.

Waar geënt werd spoedig na het stollen van het kweekmedium in de schalen is dit aangegeven door de letter α. Waar geënt werd nadat de platen 24 uur bij kamertemperatuur hadden gestaan is dit aangegeven door de letter β.

In den regel werd het resultaat beoordeeld nadat de geënte platen ± 18 uur bij 37° C. hadden gestaan. Het is aangegeven in teekens:

+	beteekent:	goede groei.
(+)	„	groei niet sterk.
+−	„	geringe groei.
+−−	„	zeer geringe groei.
(−)	„	twijfel tusschen zeer geringe groei en geen groei.
−	„	geen groei.

In het begin werd op de reeds beschreven wijze gewerkt met emulsies van bacteriën in physiologische zoutsolutie, later toen al de vibrionen in het onderzoek werden betrokken, met bouilloncultures.

Bij het onderzoek van faeces werd een emulsie gemaakt van een kleine hoeveelheid faeces in ± 4 cM^3. physiologische zoutsolutie. Om kunstmatige cholera- of pyocyaneus-faeces te krijgen werd ± 1 cM^3. van een bouilloncultuur van deze bacteriën aan de faeces-emulsie toegevoegd.

TABEL II.

| Bereidingswijze. → | I | | | | | II | | | | |

eidingswijze. →	II			III									Dieu-donné.	Esch	
a-gehalte. →	14⅔ %	14 %	13⅓ %	14 %		13⅓ %		13 %	12 %	14 % [1]	13⅓ % [1]	13 % [2]			
vaarop geënt is. →	α	α	α	α	β	α	β	α	α	α	α	α	Na 24 u. bij 37° C.	α	β
A	−	−	−										+ -		
B		(−)	(−)	(−)	+ - -	(−)	+ - -						+ - -		
C				(−)	(−)	(−)	(−)			(−)	(−)		(−)		
D				(−)	(−)	(−)	(−)			(−)	(−)		(−)		
E				−	(−)	−	(−)			−	(−)		(−)		
F				(−)	(−)	(−)	(−)			(−)	(−)		(−)		
G				(−)	(−)	(−)	(−)			(−)	(−)		(−)		
H								(−)	(−)			−	(−)	+ -	
I								(−)	(−)			+ -	(−)	+ -	
J								(−)	(−)			+ - -	(−)	+ - -	
K								−	(−)			−	(−)	+ - -	
L								(−)	(−)			−	(−)	+ - -	+
M								(−)	−			+ - -	(−)	+ -	
N								(−)	(−)			+ - -	(−)	+ - -	
D + b. pyocyaneus.				(−)	+ - -	(−)	(−)			(−)	(−)		+ -		
L + b. pyocyaneus.								(−)	(−)			−	(−)	+	+
M + Arla 6 + b. pyocyaneus.												+		+	
A + Arla 18.	(+)	+	+										+		
B. + v. Dongen.		+	+	+	+	+	+						+		
C. + v. Dongen.				+	+	+	+			+ -	+		+		
E. + v. Dongen.				+	+	+	+			+ - -	+		+		
F. + Medan.				+	+	+	+			+ -	+		+		
G. + Medan.				+	+	+	+			+ -	+		+		
M. + Arla 6.								+	+			+	+	+	+

[1] Geitebloed.

[2] Geitebloed-soda, die een week bij kamertemperatuur bewaard is.

RESULTATEN.

Door mijn proeven werd in de eerste plaats nogmaals bevestigd, wat reeds door verschillende onderzoekers over den kweekgrond van DIEUDONNÉ is medegedeeld.

Alle choleravibrionen groeiden er goed op behalve O. P., die wel een enkele maal goed was gegroeid, doch in den regel slechts zwak of bijna niet. O. P. nu is een zeer oude laboratoriumstam, die ook in de agglutinatie onregelmatigheden vertoont. Het zal dus voor de praktijk van de cholera-diagnostiek weinig hinderlijk zijn, dat dergelijke stammen niet steeds goed op Dieudonné groeien.

Niet specifieke vibrionen groeiden in den regel goed evenals cholera-vibrionen. Toch zijn er, die geëlimineerd worden, zooals El Tor 35. Dat Katendrecht α niet groeide zegt weinig, daar deze vibrio de temperatuur van 37° C. slecht verdraagt.

B. pyocyaneus groeide soms goed, soms weinig of niet. Bij mijn eerste reeks van proeven, toen ik, niet zooals bij de laatste reeks, waar uit bouilloncultures werd geënt, werkte met bacterie-emulsies in physiologische zoutsolutie, zag ik hem steeds goed groeien. Hieruit kan men afleiden, dat b. pyocyaneus alleen dan goed groeit op DIEUDONNÉ, wanneer het materiaal waarmede men ent, zeer rijk is aan bacteriën. Zoo kan men ook, met hetzelfde materiaal entende, de eene maal een positief een volgende maal een negatief resultaat krijgen, wanneer men in het eene geval bijv. een oogje bouilloncultuur over een kleinere oppervlakte uitstrijkt dan in het andere.

Hetzelfde geldt van de staph. aureus. Bij mijn entingen met emulsies in physiologische zoutsolutie zag ik hem steeds goed groeien, doch toen ik uit bouilloncultures entte bijna niet meer.

B. coli zag ik nooit duidelijk groeien op Dieudonné. De mededeeling dat b. proteus vulgaris en b. faecalis alkaligenes ook goed groeien op Dieudonné kan ik niet bevestigen. Hierbij zij nog opgemerkt, dat de gebruikte b. faecalis, afkomstig van KRAL, goed onderzocht was en een echte alkaligenes was gebleken. Wellicht is mijn in dit opzicht zoo gunstig resultaat

te danken aan het gebruik van varkensbloed in plaats van runderbloed.

De andere niet-vibrionen, waarmede ik experimenteerde, groeiden niet op Dieudonné.

Bij het onderzoek met faeces bleek, dat uit zeer verschillende soorten van faeces zich in den regel nagenoeg geen bacteriën ontwikkelden. Een enkele maal werd een geringe ontwikkeling waargenomen. Bij enting met faeces gemengd met b. pyocyaneus was de pyocyaneus éénmaal weinig, doch duidelijk waarneembaar, opgekomen, een andere maal zoo goed als niet.

Waren daarentegen choleravibrionen bij de ontlasting gevoegd dan zag men steeds een krachtige ontwikkeling van koloniën.

Mijn resultaten met Dieudonné's kweekgrond waren dus alleszins bevredigend.

Bovendien constateerde ik, dat de platen, nadat ze eenmaal 24 uur bij 37° C. hebben gestaan, langer dan een week goed blijven en telkens met gelijk resultaat gebruikt kunnen worden. Ook kan men de bloed-kaliloog na sterilisatie lang laten staan en er dan na verloop van tijd platen van maken door menging met agar in de gewone verhouding. Het is niet noodig de bloed-kaliloog eerst weer te koken. Wel moeten echter ook nu weer de platen 24 uur bij 37° C. staan.

Van de bloed-soda platen, die dadelijk [1]) geënt werden, kan het volgende gezegd worden:

Op de platen, die met een soda-oplossing van 13 pCt. of minder waren bereid, groeiden alle cholera-vibrionen goed behalve O. P. Eénmaal was Mekka op een plaat met 13 pCt. soda-oplossing bereid wel gegroeid doch niet sterk. Op de platen met 12 pCt. soda bereid groeide ook O. P. Deze stam werd

[1]) „Dadelijk" was in den regel ¾ u. of langer nadat het kweekmedium in de schalen was gegoten, daar ik mijn ent-materiaal vaak niet eerder gereed had. Eenmaal deed ik echter een vergelijkende proef, waarbij ik platen, die tegelijk uit dezelfde kolf gegoten waren, entte 20 min. resp. 1 uur nadat ze gegoten waren. In beide gevallen waren de resultaten dezelfde en goed — alle choleravibrionen ontwikkelden zich goed.

echter niet vaak genoeg gebruikt om de bewering te wettigen, dat hij steeds goed zal groeien op een plaat met een 12 pCt. soda-oplossing bereid. Ik kreeg den indruk, dat de ontwikkeling der cholera-cultures op de platen met 12 pCt. soda weliger was dan op die met 13 pCt. soda.

B. pyocyaneus groeide op platen met 13 pCt. soda-oplossing bereid niet of zeer weinig. Op platen met lager soda-gehalte kan hij onder gunstige voorwaarden wel groeien, doch wanneer de sterkte van de soda-oplossing niet beneden 12 pCt. komt, groeit hij zeker op de soda-plaat niet sterker, eerder zwakker dan op de Dieudonné-plaat.

De staph. aureus gedraagt zich op de soda-platen (12 à 13 pCt. opl.) ongeveer op dezelfde wijze als op de Dieudonné-plaat, d. w. z. bij enting uit bouilloncultuur groeide er in den regel zoo goed als niets, bij enting met emulsie in physiologische zoutsolutie zag men meestal wel ontwikkeling van koloniën.

De andere niet-vibrionen, waarmede gewerkt werd, groeiden op de soda-platen (12 à 13 pCt. opl.) evenmin als op Dieudonné. Bijzonder zij er op gewezen, dat b. coli, b. proteus vulgaris en b. faecalis alkaligenes er niet op groeiden.

Watervibrionen groeiden op de soda-platen (12 à 13 pCt. opl.) minder goed dan op Dieudonné. Alleen El Tor 10 groeide geregeld goed. Katendrecht β en Dunbar, die op Dieudonné in den regel goed groeien, groeiden meestal weinig of niet op de soda-platen. Dat in 't begin van tabel II is aangegeven, dat Katendrecht β en Dunbar ook op de soda-platen eenige malen goed zijn gegroeid, hangt mogelijk samen met de andere bereidingswijze, die toen werd toegepast. Toch werden ook toen reeds naast de positieve, negatieve resultaten geboekt en in de laatste periode van mijn proefnemingen, toen ik telkens Dieudonné- en soda-platen vergeleek en uit dezelfde bouilloncultuur entte, zag ik dikwijls, dat beide genoemde vibrionen op Dieudonné wel groeiden, maar op de soda-platen weinig of niet.

Bij het onderzoek met faeces bleek, dat uit zeer verschillende soorten van faeces zich nagenoeg geen bacteriën ontwikkelden

op platen met 12 pCt. (of sterkere) soda-oplossing bereid. In dit opzicht werd weinig of geen verschil waargenomen tusschen de platen met hooger en lager soda-gehalte (tot 12 pCt. opl.). Ook uit faeces gemengd met b. pyocyaneus zag ik zoo goed als geen ontwikkeling van bacteriën.

Waren daarentegen choleravibrionen bij de ontlasting gevoegd, dan zag men een flinke ontwikkeling van koloniën.

Uit mijn proefnemingen blijkt dus:

1°. dat soda-platen, bereid met een oplossing van 12 pCt. soda den groei van niet-cholera bacteriën minstens even sterk belemmeren als Dieudonné-platen en dat choleravibrionen er goed op groeien, ook wanneer ze met faeces zijn gemengd.

2°. dat choleravibrionen ook nog goed groeien op soda-platen met een 13 pCt. soda-oplossing bereid, terwijl op deze platen b. pyocyaneus veel minder goed groeit dan op Dieudonné-platen.

3°. dat enkele watervibrionen op de soda-platen (12 à 13 pCt. opl.) minder goed groeien dan op Dieudonné-platen.

4°. dat de soda-platen *zeer spoedig nadat ze bereid zijn kunnen worden gebruikt*, terwijl de Dieudonné-platen pas 24 uren na de bereiding voor gebruik geschikt zijn.

Door de soda-variatie wordt derhalve voorzien in de behoefte aan een kweekgrond voor choleravibrionen van sterk electieve kracht, die, wanneer onverwacht materiaal, dat op choleravibrionen moet worden onderzocht, naar een laboratorium wordt opgezonden, spoedig voor gebruik gereed kan zijn.

Daar ik den indruk kreeg, dat choleravibrionen zich op de met 12 pCt. soda-oplossing bereide platen weliger ontwikkelen dan op met 13 pCt. soda-oplossing bereide platen en de electieve kracht van de eersten zeker even sterk is als die van de Dieudonné-platen, die de proef van de praktijk reeds doorstaan hebben, beveel ik deze platen met 12 pCt. soda-oplossing voor gebruik aan.

Mocht men last hebben van de ontwikkeling van b. pyocyaneus (Crendiropoulo) of van andere bacteriën, dan kan men het

soda-gehalte van de oplossing, waarmede men de platen bereidt, tot 13 pCt. verhoogen.

Of de versch bereide soda-platen in de praktijk beter zullen voldoen dan Dieudonné-platen, die 24 u. bij 37° C. hebben gestaan, kan ik, daar ik geen echte cholera-faeces tot mijn beschikking had, niet beoordeelen. Het is zeker gewenscht, wanneer de gelegenheid zich voordoet, beide platen ter vergelijking naast elkaar te gebruiken.

Daar in het hygiënisch instituut te Amsterdam wel een geit gehouden wordt, doch geen koeien en ook geen varkens en men dus hier en in laboratoria, die in dezelfde omstandigheden verkeeren, altijd dadelijk geitebloed kan krijgen, nam ik nog een proef met geitebloed-soda platen. Zooals men in tabel III kan zien gaven platen bereid met $13^1/_3$ pCt. soda-oplossing bevredigende resultaten, die, welke met 14 pCt. soda-oplossing werden bereid, niet meer. Tegelijkertijd op dezelfde wijze bereide en onderzochte varkensbloed-soda-platen (14 pCt. opl.) gaven nog goede resultaten. Men neme dus het gehalte van de soda-oplossing, wanneer men geitebloed gebruikt, niet te hoog, niet hooger dan 12 pCt. [1])

Met geitebloed-soda (13 pCt. opl.), die een week gestaan had, had ik bij enting met zuivere cultures alsook bij enting met faeces en kunstmatige cholerafaeces goed resultaat, zooals in de tabellen te zien is. In dit geval was het geitebloed steriel opgevangen.

Een bloed-soda-mengsel, dat niet steriel is, gaat echter na eenige dagen rotten en is dan niet meer bruikbaar.

De soda-platen, zooals ik ze gebruikte, zijn ook niet steriel, doch nooit zag ik, wanneer ik ze dadelijk na de bereiding gebruikte, dat den volgenden dag verontreinigingen waren opgekomen.

Zooals uit de tabellen blijkt, kan men de platen ook een dag

---

[1]) Ook *konijnebloed* bleek — gemengd met 12 pCt. soda-oplossing — geschikt te zijn voor de bereiding van den kweekgrond (Fürstner).

bij kamertemperatuur laten staan. Werden ze dan den volgenden dag gebruikt, dan waren de resultaten ongeveer dezelfde als wanneer men de platen direct na de bereiding gebruikte.

Wil men echter platen langen tijd bewaren, dan moet men 't bloed-soda-mengsel steriliseeren (of steriel opgevangen bloed en gesteriliseerde soda-oplossing gebruiken) en dus den kweekgrond geheel naar 't voorschrift van DIEUDONNÉ bereiden. Met zulke platen heb ik echter geen uitgebreide onderzoekingen gedaan, daar steriliseeren voor 't beoogde doel niet noodig was en platen met niet gesteriliseerde bloed-soda bereid een fraaier aspect hadden.

Daar het doel van mijn proefnemingen niet zoozeer was de Dieudonné-platen te verbeteren als wel te voorzien in gevallen, waarin deze nog niet voor gebruik gereed zijn, had ik mijn doel bereikt, toen de niet-steriele bloed-soda-agar-plaat de bestaande leemte bleek aan te vullen.

NASCHRIFT BIJ DE CORRECTIE. Door de volgende proef werd bewezen, dat de boven gegeven verklaring van het feit, dat kaliloogplaten (Dieudonné) niet binnen de 24 uren te gebruiken zijn, terwijl soda-platen dadelijk geënt kunnen worden, de juiste is:

Vier gewone Dieudonné-platen werden gegoten. Twee hiervan werden na stolling gedurende ruim één uur in een atmospheer van kooldioxyde geplaatst; de beide anderen bleven gewoon open aan de lucht staan. Dadelijk daarop werden alle platen geënt met drie verschillende cholera-stammen en in de broedstoof geplaatst. Den volgenden dag waren de drie cholera-stammen op de platen, die in de koolzuur-atmospheer hadden gestaan, goed opgekomen, op die welke aan de lucht hadden gestaan niet.

Het proces, dat moet plaats hebben voor de Dieudonné-platen bruikbaar zijn, is dus niet een uitdampen van ammoniak, zooals NEUFELD en WOITHE meenen, maar een omzetting van loog in carbonaat. Dit geschiedt snel in koolzuur-atmospheer, langzaam aan de lucht.

Deeleman vond, dat choleravibrionen vooral in agar weinig meer loog doch veel meer soda verdragen dan andere bacteriën (coli, typhus). Hieruit volgt, dat kali- en natronloog *direct* niet geschikt zijn ter bereiding van electieve kweekgronden voor choleravibrionen, carbonaten daarentegen wel. Daarom kan men ook niet door vermindering van het kaliloog-gehalte van den Dieudonné-kweekgrond dezen direct voor choleravibrionen geschikt en toch sterk electief maken. De kweekgrond van Esch kan dan ook niet zoo electief zijn als de Dieudonné-kweekgrond en ondergaat, als alle met loog bereide kweekgronden, aan de lucht een omzetting, waardoor aan de oppervlakte de alcaliciteit verminderd wordt.

Wellicht kan het plaatsen van met kali- of natronloog bereide platen in koolzuur-atmospheer ook in de praktijk wel toepassing vinden. Zelf nam ik hierover geen proeven meer.

HOOFDSTUK III.

Het El Tor-vraagstuk en de vertrouwbaarheid van de agglutinatie-proef en de proef van Pfeiffer.

Bij de bespreking van de methodiek der bacteriologische herkenning van cholera asiatica hebben we ons gehouden aan de stelling, dat we in de agglutinatie-proef en de proef van Pfeiffer hulpmiddelen bezitten, waarmede we met zekerheid choleravibrionen kunnen herkennen.

Deze stelling nu is in de laatste jaren bestreden en wel naar aanleiding van het zoogenaamde El Tor-vraagstuk.

Het ontleent zijn naam aan het aan de westkust van het Sinaï-schiereiland gelegen plaatsje Tor, waar een quarantaine-station is gevestigd voor pelgrims, die na de bedevaart naar Mekka volbracht te hebben, naar hun vaderland terugkeeren.

In het jaar 1905 nu werden in dit quarantaine-station door Dr. Felix Gotschlich uit den darminhoud van de lijken van 6 pelgrims vibrionen geïsoleerd op welke door choleraserum een agglutineerende en bacteriolytische werking werd uitgeoefend. Daar nu desniettegenstaande vele bacteriologen meenden, deze vibrionen toch niet als choleravibrionen te mogen beschouwen, terwijl anderen vasthielden aan de specificiteit dezer vibrionen, ontstond het El Tor-vraagstuk, waaraan het grootste gedeelte van dit hoofdstuk is gewijd.

Er was in 1905 betrekkelijk veel zware dysenterie onder de pelgrims in het kamp te Tor, terwijl bij niemand klinische

verschijnselen van cholera werden geconstateerd. Ook bij de sectie, die bij de meeste lijken werd verricht, werden in geen enkel geval afwijkingen gevonden, die op cholera wezen.

In 't geheel werd de darminhoud van 107 lijken bacteriologisch onderzocht door na aankweeking in peptonwater op agarplaten te enten. Zoo werden in 38 van deze 107 gevallen vibrionen gevonden. Hiervan werden er 32 niet door choleraserum geagglutineerd, 6 wel. De 38 menschen, die deze vibrionen in hun darm hadden geherbergd, waren bijna allen aan darmaandoeningen overleden; de 6 personen, die agglutineerende vibrionen bij zich droegen, hadden geleden aan colitis en gangraen van het colon. In het uitstrijk-preparaat, dat steeds direct uit de faeces werd gemaakt vond men nooit meer dan enkele vibrionen, nimmer een reincultuur of de typische „vischschool" van Koch.

De pelgrims, die op hun terugreis in het quarantaine-kamp te Tor komen, kunnen in twee groepen worden verdeeld. De eerste groep wordt hoofdzakelijk gevormd door pelgrims uit Rusland en Turkije, de tweede uit Afrikaners. De eerste groep gaat op de heenreis te Yambo aan wal, blijft daar eenige dagen en gaat dan naar Medina. Hier wordt weer eenige dagen halt gehouden en dan wordt de reis voortgezet naar Mekka, waar men een week of een maand of soms nog langer blijft. De terugreis gaat dan over Djeddah naar El Tor. De Afrikaansche groep volgt juist de omgekeerde richting, gaat over Djeddah naar Mekka en daarna via Medina en Yambo naar El Tor.

Bij Mekka vieren alle pelgrims gezamelijk het Kuran-Beiramfeest, waarbij men zoo leeft, dat dit feest reeds dikwijls aanleiding gaf tot een explosief uitbreken van een choleraepidemie. Te Mekka is steeds het gevaar voor overbrengen van cholera en dus in 't algemeen van vibrionen zeer groot. Uit dezelfde tanks, waarin men zich baadt en waar men na een defaecatie den anus reinigt, wordt ook gedronken.

Het volgen van verschillende routes door de twee genoemde

groepen brengt nu mee, dat de Afrikaners vanuit Mekka El Tor in ongeveer drie weken bereiken, terwijl de Russen en Turken er minstens zes weken over doen. Hoewel op het Kuran-Beiram-feest alle pelgrims bij elkaar komen, komen de Afrikaansche bedevaartgangers toch niet in zoo nauwe aanraking met de Aziatische als deze onderling.

Nu werden de agglutineerende vibrionen, die verder als „El Tor-vibrionen" zullen worden aangeduid, allen gevonden in de periode van 6 tot 26 Maart, terwijl de niet-agglutineerbare vibrionen ook wel in deze periode, maar ook nog tot 2 Mei toe werden gevonden. In de eerste periode werden uitsluitend Aziatische pelgrims onderzocht, in de latere periode pelgrims uit beide groepen ongeveer in gelijk aantal.

De El Tor-vibrionen werden gevonden toen de dragers reeds minstens 2 à 3 maanden lang uit hun vaderland afwezig waren geweest. Reden om aan te nemen, dat ze onderweg of in de Hedjaz met cholera zouden zijn geïnfecteerd, was er niet. Wel had in 1905 zoowel in Rusland als in Turkije de cholera geheerscht en Prochnik, destijds consul van Oostenrijk-Hongarije te Djeddah, zegt dan ook: „Die Pilgerfahrt 1905 begann unter wenig günstigen Auspizien. Die Cholera in Kerbella, Mesopotamien, in Persien und im Kaukasus gab wohl Grund zu Befürchtungen, dasz mit den Pilgerzügen die Infektionskeime nach dem Hedjaz hineingebracht werden könnten und alle Aufmerksamkeit war dieser Eventualität zugewendet".

Hoewel de dragers der El Tor vibrionen dus kunnen worden ondergebracht in de groep komende uit besmette landen, waren er toch twee bij, die, volgens opgave, kwamen uit Rumelië (Eur. Turkije), waar in 1905 geen cholera was geweest.

In 1906 kon Gotschlich te Tor, bij 't onderzoek van 127 cadavers, weer in 18 gevallen, waarin de menschen overleden waren aan dysenterie en colitis, vibrionen isoleeren. In twee gevallen werden deze vibrionen door choleraserum geagglutineerd. Hier had men weer met Anatoliërs te doen, terwijl ook in 1906 in sommige streken van Klein-Azië cholera was.

De niet-specifieke vibrionen werden weer gelijkelijk bij Afrikaners en niet-Afrikaners gevonden.

In bovenstaande opsomming van gegevens is het voornaamste bijeengebracht van wat in de mededeelingen der drie het meest in dit opzicht tot oordeelen bevoegde personen (Gotschlich, geneesheer in 't quarantaine-station Tor; Ruffer, voorzitter van den „sanitary, maritime and quarantine council of Egypt", en Prochnik, consul te Djeddah, belast met het toezicht over de hygiënische toestanden onder de pelgrims) betreffende de epidemiologie te vinden is.

Terwijl de drie auteurs elkaar in de mededeeling der feiten niet weerspreken, komt Gotschlich tot de conclusie, dat men met het oog op de epidemiologische gegevens zeer wel aannemen kan, dat de El Tor-vibrionen echte cholera-vibrionen zijn, terwijl Ruffer en Prochnik de tegenovergestelde meening zijn toegedaan.

Gotschlich neemt aan, dat de El Tor-vibrionen echte cholera-vibrionen zijn, die 2 à 3 maanden lang latent gebleven zijn in den zieken darm der pelgrims.

Men zal moeielijk kunnen beweren, dat dit op zich zelf genomen een onmogelijke veronderstelling is, daar er — zooals in de inleiding werd medegedeeld — een geval bekend is, waarin de cholera-vibrionen 69 dagen lang in de faeces van een ex-patiente konden worden aangetoond.

De onderstelling van Gotschlich heeft dit voor, dat ze een ongedwongen verklaring geeft van het feit, dat de El Tor-vibrionen bij een bepaalde groep van pelgrims werden gevonden.

Ruffer neemt aan, dat de pelgrims zoowel met de El Tor-vibrionen als met de niet specifieke vibrionen zijn besmet door het drinken van water te Djeddah of Mekka. In 't water te Mekka zijn namelijk vibrionen aangetoond, echter geen agglutineerende. Het feit, dat de El Tor-vibrionen alleen gevonden zijn bij pelgrims, die over Djeddah terugkeeren, verklaart hij door er op te wijzen, dat deze een drie weken kortere reis hebben van Mekka naar El Tor dan de pelgrims, die over

Yambo terugkeeren. Deze laatsten zouden dus meer gelegenheid gehad hebben om de El Tor-vibrionen weer kwijt te raken. Daar zij echter nog wel niet specifieke vibrionen in hun darm herbergden bij overlijden te El Tor moet men, wanneer men de verklaring van RUFFER aanvaardt, aannemen dat El Tor-vibrionen zich van niet-specifieke vibrionen onderscheiden door de eigenschap spoediger dan deze uit den menschelijken darm te verdwijnen.

Het voornaamste argument, dat RUFFER tegen de onderstelling van GOTSCHLICH aanvoert is, dat wanneer we in de El Tor-vibrionen inderdaad cholera-vibrionen moeten zien door de pelgrims uit hun vaderland meegebracht, het onverklaarbaar is, dat bij de bekende toestanden te Mekka, daar in 1905 geen cholera-epidemie is uitgebroken.

Hiertegenover kan worden opgemerkt, dat het een wel geconstateerd feit is, dat tegen het einde van een epidemie het aantal „bacillendragers" toeneemt, waaruit men mag afleiden, dat choleravibrionen tijdens het verloop van een epidemie zulke veranderingen kunnen ondergaan, dat ze tenslotte minder geschikt zijn om menschen ziek te maken. Zoo zou men — op 't oogenblik afgezien van alle bacteriologische tegenargumenten — kunnen veronderstellen, dat El Tor-vibrionen choleravibrionen zijn, die de eigenschap, menschen te kunnen ziek maken, tijdelijk of voor goed verloren hebben. Stemt men toe, dat choleravibrionen in zulk een toestand zouden kunnen komen, dan vervallen daarmede de voornaamste bedenkingen tegen de onderstelling van GOTSCHLICH.

Een derde hypothese, die naar het mij voorkomt de voorstanders van de cholera-natuur der El Tor-vibrionen nog meer in 't gevlei komt, wordt dan ook aannemelijk, namelijk deze, dat er onder de pelgrims van de eerste (Arabische) groep enkelen reeds El Tor-vibrionen-dragers zijn geweest bij den aanvang van hun reis en dat deze onderweg anderen hebben besmet. Dan vervalt 1°. de moeilijkheid, dat een termijn van 2 à 3 maanden voor een choleravibrionendrager wel wat

lang is, 2°. de moeielijkheid, dat er onder de El Tor-vibrionendragers twee waren waarschijnlijk afkomstig uit Rumelië, waar in 1905 geen cholera was, 3°. de nog niet genoemde moeielijkheid, in een noot van RUFFER's mededeeling vermeld, dat in 1907 ook een agglutineerende vibrio werd gevonden bij een aan colitis gestorven pelgrim uit Algiers. Immers bij aanname van laatstgenoemde onderstelling is 't wel waarschijnlijk, dat de El Tor-vibrionendragers hoofdzakelijk tot de eerste groep zullen beperkt blijven, maar niet uitgesloten, dat ook de tweede groep kan worden geïnfecteerd.

Het komt mij om bovengenoemde redenen voor, dat de mogelijkheid, dat de El Tor-vibrionen choleravibrionen zouden zijn, niet op epidemiologische gronden kan worden uitgesloten. Verder kan men niet gaan. De epidemiologie kan het natuurlijk nooit waarschijnlijk maken, dat de El Tor-vibrionen choleravibrionen zijn. Dit verwacht men ook niet van haar. Bij de beoordeeling van den aard der El Tor-vibrionen zijn we dus geheel op het onderzoek der bacteriën zelf aangewezen.

De El Tor-vibrionen onderscheiden zich morphologisch in geen enkel opzicht van cholera-vibrionen. Wel zijn er onderlinge verschillen, maar niet sterker dan men deze ook bij choleravibrionen vindt. Ook in andere eigenschappen — ontbreken van pathogeniteit voor duiven, coagulatievermogen voor melk, phosphorescentie enz. — kwamen ze geheel met choleravibrionen overeen.

Stam No. 5 vertoonde 't meest teekenen van degeneratie — zeer zwakke nitroso-indolreactie, verlangzaamde eigenbewegelijkheid, neiging tot vorming van involutievormen, zwakkere groei op agar en zeer geringe virulentie.

De 32 tegelijkertijd gevonden, niet specifieke vibrionen konden behalve door de biologische reacties ook allen nog door de een of andere eigenschap (duiven-pathogeniteit, coagulatie der melk, nitroso-indolreactie, cavia-pathogeniteit) van choleravibrionen worden onderscheiden.

We komen nu tot de biologische reacties en willen in de

eerste plaats nagaan, wat door de verschillende onderzoekers als resultaat der agglutinatie-proef wordt opgegeven.

Gotschlich, die de vibrionen vond en dadelijk met agglutineerend serum onderzocht, vermeldt het volgende:

Stam.	Hoogste serumverdunning, waarbij de agglutinatie nog optrad.
El Tor I	1 : 1000.
El Tor II	1 : 2000.
El Tor III	1 : 1000.
El Tor IV	1 : 1000.
El Tor V	1 : 500.
El Tor VI	1 : 2000.

Het serum, dat gebruikt werd was paardeserum met titer 1 : 3000.

Kraus en Přibram vonden bij hun onderzoek, dat hoogwaardig choleraserum de El Tor-stammen in even hooge verdunningen agglutineert als gewone cholera-stammen. Alle El Tor-stammen werden nog geagglutineerd bij een serum-verdunning van 1 : 10000.

Geheel anders is wat Markl opgeeft:

Stammen.	Hoogste Serumverdunning bij welke nog agglutinatie optrad.
El Tor I	1 : 100
El Tor II	1 : 500 (zwak)
El Tor III	1 : 1000 (zwak)
El Tor IV	1 : 1000 (zwak)
El Tor V	1 : 500 (zwak)
El Tor VI	1 : 500 (zwak)

Wat de titer was van het gebruikte serum, is niet aangegeven. Slechts wordt vermeld, dat echte cholera-stammen bij een serumverdunning 1 : 1000 nog goed geagglutineerd werden.

Schumacher geeft aan, dat al de zes El Tor-stammen door een hoogwaardig paarde-choleraserum bijna tot aan de titerverdunning werden geagglutineerd. Hij nam echter bij den stam El Tor I een eigenaardig verschijnsel waar. Toen hij trachtte dezen met een konijne-serum van titer 1 : 2000 te

agglutineeren, bemerkte hij, dat dit alleen mogelijk was bij een zoo lage verdunning, dat daarbij ook niet-choleravibrionen werden geagglutineerd. Ook bij aanwending van een hoogwaardig konijneserum (titer 1 : 12000) werd een dergelijk verschijnsel waargenomen. De hoogste verdunning, waarbij El Tor I nog geagglutineerd werd, was 1 : 1000 (zwak).

Meinicke, Jaffé en Flemming vonden, dat de agglutinabiliteit der El Tor-stammen niet afwijkt van die van gewone choleravibrionen.

Neufeld en Haendel geven eveneens aan, dat de El Tor-vibrionen zich bij de agglutinatie-proef geheel als choleravibrionen gedragen. Alleen El Tor III werd een beetje zwakker geagglutineerd namelijk tot 1 : 5000 met een cholera-serum, waarvan de titer was 1 : 10000.

Wat betreft de proef van Pfeiffer, deelen Gotschlich en Ruffer mede, dat deze bij alle El Tor-stammen, die er virulent genoeg voor waren, positief was. Alleen El Tor V was te weinig virulent om er de proef van Pfeiffer mee te kunnen doen. Ruffer deed de proef van Pfeiffer niet op de gewone wijze, doch paste een door Metchnikoff aangegeven variatie toe. In de buikholte van een cavia werden 3 à 4 cM³. bouillon gespoten. Vier uur later werd de vloeistof, nu vol leucocyten, afgetapt en tot den volgenden dag in de ijskast gezet. Van deze vloeistof werd nu een spoortje gevoegd bij een suspensie van vibrionen in cholera-serum. Bij cholera-vibrionen en ook bij El Tor-vibrionen werden nu korrels gevormd, waardoor het aspect van het praeparaat geheel anders werd dan dat van een contrôle-praeparaat.

Bij andere onderzoekers vond ik geen opgaven over resultaten met de proef van Pfeiffer verkregen.

Een derde wijze, waarop men langs serologischen weg specifieke eigenschappen van vibrionen kan constateeren is, dat men dieren met de vibrionen, die onderzocht moeten worden, behandelt en nu nagaat hoe het serum van deze proefdieren op vibrionen van bekende soort werkt.

Ook volgens deze methode zijn de El Torvibrionen onderzocht.

Gotschlich bereidde sera met de zes El Tor-stammen. Elk van deze sera agglutineerde al de El Tor-stammen nog in verdunning 1 : 2000. 't Serum met El Tor V verkregen werkte even goed als de andere sera. De El Tor-sera (II en V werden hierop onderzocht) werkten ook specifiek op echte choleravibrionen.

In de proef van Pfeiffer werkten alle El Tor-sera onderling specifiek en ook op echte choleravibrionen hadden ze bacteriolytische werking.

Kraus en Přibram constateerden, dat sera gewonnen met de El Tor-stammen I, III en V ook echte cholera-stammen agglutineeren even hoog als El Tor-stammen.

Serum-El Tor III agglutineerde enkele Tor-stammen en ook cholera-stammen tot 1 : 1000, andere El Tor-stammen slechts tot 1 : 500 en 1 : 200.

Serum-El Tor V agglutineerde stam V en ook cholera in 200-voudige verdunning nog, El Tor I, IV en VI echter slechts tot 100-voudige verdunning. Geen enkel van de sera met deze 6 stammen gewonnen agglutineerde niet-cholera-vibrionen hooger dan normaal serum van hetzelfde proefdier.

Ook de verzadigingsproef van Castellani heeft Ruffer gedaan met choleraserum en El-Tor-vibrionen. Hij vond, dat de El Tor-vibrionen de specifieke agglutininen van een choleraserum geheel kunnen absorbeeren. Door deze eigenschap onderscheiden de El Tor-vibrionen zich van alle andere tot nogtoe bekende niet-cholera-vibrionen. Overigens is de proef van Castellani niet bruikbaar in de cholera-diagnostiek, daar er, zooals Meinicke, Jaffé en Flemming hebben aangetoond echte cholerastammen zijn, die toch aan een choleraserum de specifieke antilichamen voor sommige andere echte cholera-stammen niet kunnen onttrekken. Na verzadiging met stam A werkt dan het serum nog bijna even sterk als oorspronkelijk op stam B. Niet choleravibrionen zijn echter niet in staat aan een cholerasurum de voor choleravibrionen specifieke antilichamen te onttrekken. De

door RUFFER vermelde uitslag van de proef van CASTELLANI met de El Tor-vibrionen heeft dus wel eenige beteekenis.

Tenslotte heeft men ook de komplementbindingsproef volgens de methode van BORDET en GENGOU met de El Tor-vibrionen gedaan. De waarde van deze reactie voor de herkenning van choleravibrionen is echter nog zeer twijfelachtig. SCHÜTZE kwam tot de conclusie, dat we in de komplementbindingsproef geen zeker middel mogen zien om choleravibrionen van op hen gelijkende vibrionen te onderscheiden. RUFFER onderzocht op deze wijze 24 verschillende vibrionen-stammen, die niet geagglutineerd werden door choleraserum. Van deze 24 stammen gaven er toch 14 positieve komplementbindingsproef. De waarde van deze proef staat dus volstrekt niet gelijk met die van de agglutinatieproef en van de proef van PFEIFFER.

De resultaten door de verschillende onderzoekers volgens deze methode voor de El Tor-vibrionen verkregen stemmen niet overeen. NEUFELD en HAENDEL kwamen tot de conclusie, dat El Tor-vibrionen wat betreft de binding der anti-lichamen op specifiek cholera-serum reageerden als echte cholera-vibrionen. RUFFER en MARKL daarentegen kwamen tot een tegenovergesteld resultaat. Volgens hen treedt geen fixatie van het komplement op, wanneer men dit bij cholera-serum, waarin El Tor-vibrionen gebracht zijn, voegt. Resumeerende mogen we van de El Tor-vibrionen het volgende vaststellen:

1°. Dat ze zich in de agglutinatie-proef in den regel geheel gedragen als echte cholera-vibrionen, terwijl nu en dan niet verklaarde onregelmatigheden zijn waargenomen.

2°. Dat de proef van PFEIFFER positief is.

3°. Dat El Tor-sera specifieken invloed hebben op choleravibrionen, doch dat bij proeven hierover quantitatieve verschillen gevonden werden.

4°. Dat ze de specifieke anti-lichamen uit cholera-sera kunnen absorbeeren.

5°. Dat de opgaven over de komplementbindingsproef elkaar weerspreken.

De vier eerstgenoemde proeven geven dus op de vragen, waar het om gaat, of de El Tor-vibrionen in cholera-sera voor hen specifieke anti-stoffen vinden en of zij de vorming van voor cholera-vibrionen specifieke anti-stoffen kunnen opwekken, een bevestigend antwoord.

Neemt men de agglutineerende en bacteriolytische werking van cholera-serum op El Tor-vibrionen waar en komt men dan toch op grond van een negatieve komplementbindingsproef, zooals Markl, tot de conclusie, dat de El Tor-stammen in cholera-serum geen anti-stoffen vinden, dan heeft men vergeten, dat men nooit ter wille van hypothesen de oogen sluiten mag voor feiten.

Onze conclusie moet dus zijn, dat de biologische reacties geen duidelijk verschil aanwijzen tusschen El Tor-vibrionen en cholera-vibrionen, hoewel de reacties niet steeds een geheel typisch verloop hebben.

De eersten, die werkelijke verschillen tusschen El Tor-vibrionen en gewone cholera-vibrionen hebben aangetoond zijn geweest Kraus en Přibram.

Zij constateerden, dat de zes El Tor-stammen haemolytische en acuut toxische werking vertoonen op zulk een wijze als dit bij gewone cholera-vibrionen niet wordt aangetroffen.

Kraus had reeds vroeger aangetoond, dat choleravibrionen niet in staat zijn oplosbare haemotoxinen te produceeren, terwijl in bijna alle bouillon-cultures van niet specifieke vibrionen oplosbare haemotoxinen konden worden aangetoond. Tot dezelfde resultaten waren ook Přibram en Meinicke gekomen.

Nu gelukte het aan Kraus en Přibram bij het onderzoek van bouillon-cultures van El Tor-vibrionen hierin haemotoxinen aan te toonen. Voegden zij 0,01 cM^3. van een bouilloncultuur van El Tor-vibrionen, die twee dagen bij 37° C. gestaan had, bij 5 cM^3. van een 5 pCt. suspensie van gedefibrineerd konijnenbloed, dan trad reeds na één uur haemolyse op. Voegde men 0,005 cM^3. van de bouilloncultuur toe, dan trad de haemolyse pas na 16 uur op. Ook het door een Reichel-filter verkregen

filtraat van een bouilloncultuur van El Tor-vibrionen had het vermogen om roode bloedlichaampjes op te lossen. Bij de verschillende stammen werd geen onderscheid in de intensiteit van de haemolytische werking waargenomen.

Bij een vernieuwd onderzoek van echte cholera-stammen gelukte het weer niet hierbij haemotoxine-productie aan te toonen.

Ook door middel van de agar-bloedplaat (geitebloed) kon men verschil tusschen de zes El Tor-stammen en de zes ter contrôle onderzochte cholerastammen constateeren. Terwijl zich om de koloniën der El Tor-vibrionen steeds duidelijk een lichter gekleurde hof vormde, kon men bij de cholerastammen zelfs na 48 uur nog niet zulk een hof waarnemen.

Door immuniseering van geiten of konijnen gelukte het de vorming van antitoxinen tegenover de El Tor-haemolysinen of haemotoxinen op te wekken. Het serum van normale geiten en paarden, kon zelfs wanneer het in een hoeveelheid van 0,5 cM³ tegelijk met de haemolysinen aan een suspensie van roode bloedlichaampjes werd toegevoegd, de haemolyse niet verhinderen. Agglutineerend en bacteriolytisch paardeserum gedroeg zich in dit opzicht als het normale. Had men daarentegen geiten of konijnen met bouillon-cultures van El Tor-vibrionen, waarin haemotoxinen aanwezig waren, behandeld, dan kreeg men een serum, dat in duizendvoudige verdunning nog in staat was de El Tor-haemotoxinen te neutraliseeren. Het serum gewonnen door behandeling met de haemotoxinen van één stam neutraliseerde ook de haemotoxinen van de andere stammen.

Vele vibrionen b.v. de v. Nasik, v. Metchnikoff, v. Danubicus enz., die door de biologische reacties en ook voor een groot gedeelte morphologisch en door de wijze, waarop ze in of op kweekgronden groeien zich onderscheiden van de cholera- en El Tor-vibrionen produceeren haemotoxinen, die onderling identiek zijn en ook identiek zijn met die der El Tor-vibrionen. Dit blijkt hieruit, dat de anti-haemotoxinen, door één dezer vibrionen-haemotoxinen gevormd, in staat zijn de haemotoxinen van al de verschillende vibrionen-stammen te neutraliseeren.

Kraus en Přibram merken hierbij op, dat men hier te doen schijnt te hebben met een verschijnsel analoog aan dat, hetgeen men bij sommige giftplanten vindt. Er zijn giftige planten van verschillende soort, die toch dezelfde alkaloiden bevatten. Zoo toonde Ehrlich aan, dat robine door antiricine kan geneutraliseerd worden.

Ook de onderzoekers, die na Kraus en Přibram over dit onderwerp gewerkt hebben, zijn er nooit in geslaagd filtreerbare haemolysinen in cultures van cholera-vibrionen in vloeibare kweekmedia aan te toonen. Men vindt ze ook niet in de vloeibare cultures zelf. Verder zijn de mededeelingen van Kraus en Přibram over de haemolysinevorming der El Tor-vibrionen door velen bevestigd, zoodat dit nu wel als een vast staand feit mag worden beschouwd.

Liefmann en Nieter en Neufeld en Haendel geven aan, dat de haemolysinevorming der El Tor-vibrionen wisselt in sterkte, terwijl Kolle en Meinicke er niet in slaagden bij de El Tor-vibrionen productie van filtreerbare haemolysinen aan te toonen.

Ook bij enting op de geitebloed-agar-plaat kan men verschil waarnemen in de werking der El Tor-vibrionen en der cholera-vibrionen. Choleravibrionen — althans oudere laboratorium-cultures — vormen in den regel in de eerste 48 uren geen ophelderingszône, terwijl de El Tor-vibrionen reeds na 24 uren een duidelijken lichter gekleurden hof hebben gevormd. Het kan echter voorkomen, dat vooral versche cholera-stammen vrij spoedig een hof vormen. (De stam „van Dongen" vormde in de eerste maand nadat hij was geïsoleerd reeds binnen de 24 uren een hof; deze eigenschap ging echter spoedig verloren). Er is echter verschil tusschen de hof door El Tor-vibrionen en de hof door choleravibrionen gevormd. Van Loghem nam waar, dat bij choleravibrionen de hof groenachtig van tint is, bij El Tor-vibrionen daarentegen kleurloos, wellicht iets roodachtig getint. Bij spectroscopisch onderzoek bleek, dat in de heldere zône rondom de El Tor-kolonies de oxyhaemoglobinestrepen nog

duidelijk zichtbaar zijn, terwijl zij in de heldere zône van de cholerakolonies ten eenenmale ontbreken. Uit de hofvorming door cholera-stammen mag men dus niet afleiden, dat ook deze wel eenig haemolytisch vermogen hebben. De hofvorming bij cholera-vibrionen schijnt meer op een proteolytisch proces te berusten [1]).

Over de tweede eigenschap, waardoor El Tor-vibrionen zich van cholera-vibrionen onderscheiden — de productie van een acuut werkend toxine — deelen KRAUS en PŘIBRAM mede, dat ze in de bouillon-cultures van al de 6 El Tor-stammen, reeds wanneer deze twee dagen oud zijn, een gift konden aantoonen, dat, wanneer het bij konijnen in een vene wordt ingespoten, deze binnen weinige minuten tot 1 uur kan dooden. De ademhaling der konijnen werd frequenter, zij werden onrustig, kregen paresen en paralysen en stierven na 2 tot 60 minuten onder convulsieve verschijnselen. Het sterkst giftig waren de stammen IV en V, waarvan 0,25 à 0,5 cM³. bouilloncultuur in staat was de proefdieren binnen 1 uur te dooden. Daar de filtraten met Reichel-filters verkregen ook giftig waren, kwamen KRAUS en PŘIBRAM tot de conclusie, dat men hier met een oplosbaar gift te doen had. Het vergift werkte ook op cavias, kippen en duiven.

Het gelukte KRAUS en PŘIBRAM door behandeling van proefdieren met het acuut werkende toxine een serum te verkrijgen, dat een antitoxine tegenover het acuut werkende El Tor-toxine bevat. Ook in normaal serum van paarden en geiten zijn stoffen aanwezig, die dit gift neutraliseeren echter eerst dan, wanneer serum en gift ± ½ uur gemengd bij 37° C. gestaan hebben.

---

[1]) WLADIMIROFF deelt mede, dat in de laatste epidemie in Rusland versch geïsoleerde choleravibrionen gewoonlijk haemolytisch werkten, zoowel in de bloed-agar-plaat als in een erythrocyten-emulsie. Hofvorming op de agar-bloedplaat bewijst — zooals VAN LOGHEM aantoonde — geen haemolyse, ook niet op de geitebloed-plaat. In een erythrocyten-emulsie heeft haemolyse alleen dan beteekenis, wanneer men geschikt bloed (bijv. geitebloed) gebruikt. Daar niet wordt vermeld, welk bloed gebruikt werd, mogen we uit deze mededeeling van WLADIMIROFF niet besluiten tot haemolytisch vermogen van choleravibrionen.

Spuit men een proefdier direct na de menging met een mengsel van normaal serum en toxine in, dan gaat het even snel te gronde als wanneer men het gift alleen inspuit. Het serum der met toxine behandelde dieren kan echter dadelijk nadat het aan de toxine-oplossing is toegevoegd de werking van het gift opheffen.

Reeds vroeger had Kraus in filtraten van bouilloncultures van v. Nasik toxinen aangetoond, die voor konijnen, cavias en vogels giftig waren. Het bleek nu dat het antitoxine gewonnen met het toxine van de v. Nasik ook het toxine der El Tor-vibrionen kon neutraliseeren, zoodat men hieruit mag afleiden dat deze toxinen identiek zijn. Ook de meeste der 32 niet agglutineerende vibrionen, die in 1905 te Tor geïsoleerd werden, produceerden niet alleen haemotoxinen, maar ook acuut werkende toxinen, die men, zooals bleek uit de uitkomsten der immunisatieproeven, als identiek mag beschouwen met die der El Tor-vibrionen.

Enkele onderzoekers (Mühlens en Von Raven, Pfeiffer en Friedberger, Liefmann en Nieter) vonden ook het acuut werkende toxine. Anderen (Kolle en Meinicke, Haendel en Woithe) slaagden er niet in het aan te toonen. Liefmann en Nieter konden eerst in de El Tor-bouilloncultures geen toxinen aantoonen, later toen ze versche stammen van Kraus hadden gekregen wel. In de filtraten van bouilloncultures werden echter — voor zoover mij bekend is — door latere onderzoekers geen acuut werkende toxinen aangetoond. Kraus en Pribram geven trouwens ook reeds aan, dat de giftigheid van een bouillon-cultuur door filtratie veel zwakker wordt.

Toen Kraus en Pribram bij El Tor-vibrionen oplosbare toxinen vonden, had men deze bij cholera-vibrionen nog niet met zekerheid kunnen aantoonen. Spoedig daarop gelukte dit echter aan Brau en Denier en later ook aan Kraus en anderen. Filtraten van alkalische bouillon-cultures door Reichelfilters hebben sterk giftige werking op cavias. Het gelukte ook de vorming van tegenover deze toxinen werkzame antitoxinen op te wekken.

Het is hier de plaats niet om in te gaan op de vraag of men deze toxinen moet opvatten als stofwisselingsproducten der choleravibrionen of, zooals PFEIFFER wil, als ontledingsproducten van de in het lichaam der bacteriën aanwezige giftige stoffen, die na den dood der bacteriën door destructie oplosbaar worden, zoodat hierbij een proces plaats grijpt als bij de vorming van pepton uit eiwit. Hoe het zij, men kent tegenwoordig ook oplosbare cholera-toxinen.

Er is echter een verschil tusschen de toxinen der choleravibrionen en die der El Tor-vibrionen. De eersten zijn veel minder giftig voor konijnen, muizen, duiven en kippen dan de laatsten, die hierop even sterk werken als op cavias. Ook werken de giften der El Tor-vibrionen bij intraveneuse injectie veel sneller dan die der cholera-vibrionen. De El Tor-toxinen zijn ook minder labiel.

Antitoxisch El Tor-serum kan cholera-toxinen neutraliseeren. Antitoxisch choleraserum kan daarentegen de El Tor toxinen niet neutraliseeren. Antitoxisch serum met v. Nasik-toxinen bereid kan de cholera-toxinen niet neutraliseeren, wel het acuut werkende toxine der El Tor-vibrionen. KRAUS leidt hieruit af, dat de El Tor-vibrionen waarschijnlijk twee giften produceeren: 1°. het acuut werkende toxine identiek met dat van de v. Nasik en andere niet specifieke vibrionen; 2°. een toxine identiek met dat der cholera-vibrionen.

Hiermede zijn de voornaamste gegevens, die ons ten dienste staan bij de beoordeeling van de El Tor-vibrionen bijeengebracht. Resumeerende mogen we dus zeggen:

1°. Dat de El Tor-vibrionen door hun morphologische kenmerken en door hun groeiwijze niet van choleravibrionen kunnen worden onderscheiden.

2°. Dat ook de biologische reacties geen aanleiding geven om aan de El Tor-vibrionen een afzonderlijke plaats te geven.

3°. Dat de El Tor-vibrionen zich van choleravibrionen onderscheiden door hun haemolytische werking en door een toxische werking, die afwijkt van die der cholera-vibrionen.

4°. Dat uit de epidemiologische gegevens niets is af te leiden aangaande de soort waartoe de El Tor-vibrionen moeten gerekend worden.

Nu staan aan den eenen kant zij, die de haemolytische en acuut toxische eigenschappen der El Tor-vibrionen beschouwen als verschijnselen van degeneratie (Crendiropoulo) of van mutatie (E. Gotschlich) en de El Tor-vibrionen als cholera-vibrionen beschouwen, aan den anderen kant zij, die met Kraus van oordeel zijn, dat de nieuw gevonden eigenschappen het voldoende wettigen om aan de El Tor-vibrionen een afzonderlijke plaats naast de cholera-vibrionen te geven.

Dat er inderdaad een onderscheid is tusschen de El Tor-vibrionen en gewone choleravibrionen staat nu wel vast, daar met name de haemolytische eigenschap — al is deze dan ook evenmin als de vorming van het acuut werkende toxine een voor een vibrionensoort kenmerkende eigenschap — constant en nu reeds jaren lang bij de El Tor-vibrionen wordt gevonden, terwijl ze bij cholera-vibrionen steeds wordt gemist. Het schijnt mij echter toe, dat op de vraag, waar het eigenlijk om gaat, of de El Tor-vibrionen afstammelingen zijn van vibrionen, die cholera-epidemiën hebben veroorzaakt en of ze onder bepaalde omstandigheden zelf oorzaak van een cholera-epidemie zouden kunnen worden, geen beslissend antwoord kan worden gegeven. Behalve de 6 in 1905 te El Tor gevonden agglutineerende vibrionen is er in den loop der volgende jaren reeds een vrij aanzienlijk aantal vibrionen gevonden, die, wanneer men deze onderscheiding maken mag, als El Tor-vibrionen, niet als cholera-vibrionen moeten beschouwd worden. Enkelen daarvan zijn gekweekt uit „cholera-gevallen", wat natuurlijk nog niet bewijst, dat ze ook de oorzaak der ziekte waren, daar immers ook wel zeker niet-specifieke vibrionen in den darminhoud van cholera-patienten zijn gevonden. Een grootere of kleinere epidemie veroorzaakt door El Tor-vibrionen heeft men echter nooit waargenomen.

Op geheel andere gronden heeft Zlatogoroff de betrouwbaarheid der agglutinatieproef bestreden.

Hij deelt mede in 1907 uit water 23 vibrionen-stammen gekweekt te hebben, die door morphologische en cultuur-eigenschappen niet van cholera-vibrionen te onderscheiden waren. Slechts 5 van deze stammen werden door een specifiek cholera-serum (titer 1 : 20000) geagglutineerd en dan nog in een verdunning niet hooger dan 1 : 5000. Bij al de andere vibrionen trad geen agglutinatie op bij een serumverdunning 1 : 500. Deze werden dus als niet-cholera-vibrionen beschouwd.

Door herhaalde overenting van agar op agar gepaard met cavia-passages werd nu de agglutineerbaarheid van 10 dezer 18 eerst niet-agglutineerende stammen zoo veranderd, dat ze door een serum van titer 1 : 20000 nog bij een verdunning 1 : 5000 werden geagglutineerd. Zlatogoroff trok hieruit de conclusie, dat hij te doen had met cholera-vibrionen, die onder invloed van langdurig verblijf in water hun agglutineerbaarheid tijdelijk hadden verloren en deze nu door dierpassages en overentingen hadden teruggekregen.

Slechts één van deze cultures was virulent genoeg om er de proef van Pfeiffer mee te doen. Deze was toen positief.

Nu bracht Zlatogoroff cholera-vibrionen, die door cholera-serum in verdunning 1 : 10000 werden geagglutineerd in Newa-water. Na enkele dagen werden ze door aankweeking in pepton er weer uitgehaald en daarna weer in Newa-water gedaan. Nadat ze op deze wijze vijfmaal, telkens gedurende ongeveer 7 dagen, in Newa-water geweest waren, was de hoogste serum-verdunning, waarbij ze nog geagglutineerd werden 1 : 400. Door overentingen van agar op agar steeg de agglutineerbaarheid weer, zoodat de vibrionen door cholera-serum bij verdunning 1 : 5000 werden geagglutineerd. Een tweede dergelijke proef gaf een zelfde resultaat. Het water, waarin de vibrionen werden gebracht, had een temperatuur van 10 – 14° C. Niet steeds gelukte het echter op deze wijze de agglutineerbaarheid te verminderen.

Ook door vibrionen in gedistilleerd water te brengen, na eenige dagen te centrifugeeren en herhaaldelijk na de bovenstaande vloeistof te hebben afgeschonken versch gedistilleerd water op het centrifugaat te gieten zag Zlatogoroff de agglutineerbaarheid van de vibrionen sterk verminderen (van 1 : 5000 tot 1 : 200). De zeker zeer gewichtige conclusie lag voor de hand: wanneer men een vibrio uit water isoleert, bewijst het ontbreken van agglutineerbaarheid door choleraserum niet, dat men met een niet-cholera-vibrio te doen heeft.

Barrenscheen, die de proeven van Zlatogoroff herhaalde, zag onder invloed van gedistilleerd water de agglutineerbaarheid van een cholerastam, naar hij mededeelt, van 1 : 40000 tot 1 : 200 à 1 : 400 dalen.

Daarentegen konden Haendel en Woithe, die een suspensie van cholera-vibrionen in gedistilleerd water maakten, na eenige dagen hieruit op agar entten, waarbij tegelijkertijd de agglutinabiliteit onderzocht werd, ook na aldus herhaalde malen cholera-vibrionen van gedistilleerd water op agar en van de agar weer in gedistilleerd water gebracht te hebben geen verandering in de agglutineerbaarheid constateeren.

Tot hetzelfde resultaat kwam Köhlisch, die nooit door passages door rivier- of leidingwater of gedistilleerd water vermindering van de agglutinabiliteit van cholera-vibrionen waarnam. Ook kon hij bij geen enkele der door hem onderzochte vibrionen, die tijdens een cholera-epidemie te St. Petersburg uit water waren gekweekt en die niet agglutinabel waren door herhaalde overentingen agglutinabiliteit opwekken. Hij wijst op een bron van fouten (naar aanleiding van eigen ervaring), die men maken kan, wanneer men niet met steriel water werkt. Dan kan men namelijk een cholera-vibrio in het water brengen en na eenigen tijd een niet specifieke vibrio er weer uit kweeken. Zoo kan men in den waan komen, dat de cholera-vibrio zijn agglutinabiliteit verloren heeft.

Daar Zlatogoroff echter mededeelt, dat hij uitging van agglutineerbare vibrionen, daarna door invloed van water niet-

agglutineerbare vibrionen kreeg en deze door overentingen en dierpassages weer agglutinabel zag worden heeft hij, indien zijn waarnemingen juist zijn, zijn stelling bewezen. Dan moeten echter zijn proefnemingen ook met gelijke uitkomsten kunnen worden herhaald. Tot nog toe zijn ze echter niet voldoende bevestigd (eerder is het tegendeel het geval) om het aanvaarden van zijn ver strekkende conclusies te wettigen.

Zoolang in het El Tor-vraagstuk nog niet meer helderheid is gekomen en de proeven van Zlatogoroff niet herhaaldelijk bevestigd zijn, zal men wel doen *in de praktijk* der cholera-diagnostiek het er voor te blijven houden, dat we in de agglutinatie-proef en de proef van Pfeiffer vertrouwbare middelen hebben om cholera-vibrionen met zekerheid te herkennen.

STELLINGEN.

I.

De opvatting, dat de El Tor-vibrionen geen cholera-vibrionen zijn, vindt geen steun in de epidemiologie.

II.

Als hoofdmaatregel ter bestrijding van de cholera in Nederlandsch-Indië moet ingevoerd worden het stelselmatig (desnoods gedwongen) isoleeren van alle eerste gevallen.

III.

Parthenogenesis komt bij malaria-parasieten niet voor.

IV.

Milt-palpatie is de beste methode om bij de bevolking van een bepaalde landstreek het percentage plasmodium-dragers te bepalen.

V.

De methode, om drinkwater te beoordeelen naar het aantal aanwezige coli-bacillen, is niet aan te bevelen.

VI.

Voor de verbreiding van de tuberculose onder de menschen heeft de rundertuberculose slechts een zeer ondergeschikte beteekenis.

VII.

In de aetiologie der recidiveerende glasvochtbloedingen speelt de tuberculose een groote rol.

VIII.

Een der voornaamste oorzaken van intermitteerend hinken is misbruik van tabak.

IX.

Een processess vermiformis, die éénmaal ontstoken is geweest, moet verwijderd worden.

X.

Bij placenta praevia is de methode van Braxton Hicks te verkiezen boven de spoedverlossing volgens Bonnaire.

XI.

In gevallen waarin men kiezen kan tusschen hebotomie en sectio caesarea behoeft men niet steeds aan de laatste operatie de voorkeur te geven.

XII.

Er is behoefte aan een instituut voor tropische geneeskunde in Nederland. Amsterdam is daarvoor de aangewezen plaats.

Druk van J. H. de BUSSY, Amsterdam.